

Prävalenz und Pathogenität schwach hämolysierender Brachyspiren bei Mastschweinen in Nordhessen

Verena Vögely



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. em. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

**Prävalenz und Pathogenität
schwach hämolysierender Brachyspiren
bei Mastschweinen in Nordhessen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Verena Vögely
Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen, 2015

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. em. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 18.03.2015

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster:

Vögely, V., S. Barth, G. Baljer, Herbst, W.

Prevalence of weakly hemolytic *Brachyspira* spp. in fattening pig farms in Northern Hesse, Germany

6th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Berlin, 5.-8. Juni 2013

Vögely V., S. Barth, G. Baljer, W. Herbst

Detection of weakly haemolytic *Brachyspira* spp. in a representative number of randomly selected pig farms in Northern Hesse, Germany

6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Surrey, England, 5.-6. September 2013

W. Herbst, V. Vögely, S. Barth, G. Baljer, C. Ewers

Distribution of weakly hemolytic *Brachyspira* spp. in pig farms in Northern Hesse, Germany
DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, München, 26.-28. Mai 2014

Diese Arbeit wurde durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Definition der schwach hämolysierenden Brachyspiren	3
2.2 Diagnostik und Speziesdifferenzierung von Brachyspiren	3
2.2.1 Kultureller Nachweis von Brachyspiren	3
2.2.2 Biochemische Methoden zur Speziesdifferenzierung von Brachyspiren	4
2.2.3 Proteinanalytische Analysen mittels MALDI-TOF MS zur Speziesdifferenzierung von Brachyspiren	6
2.2.4 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis und zur Differenzierung von <i>Brachyspira</i> spp.	6
2.3 Pathogenese, klinische Bedeutung und Prävalenz von <i>B. pilosicoli</i>, <i>B. intermedia</i>, <i>B. innocens</i> und <i>B. murdochii</i>	11
2.3.1 <i>Brachyspira pilosicoli</i>	11
2.3.2 <i>Brachyspira intermedia</i>	13
2.3.3 <i>Brachyspira innocens</i>	15
2.3.4 <i>Brachyspira murdochii</i>	17
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer	27
3.1.2 Bakterienstämme	27
3.1.3 Herkunft der Proben	28
3.1.4 Gewinnung der Proben	29
3.2 Kulturell-bakteriologische Methoden	29
3.2.1 Anzucht von Bakterien	30
3.2.1.1 <i>Brachyspira</i> spp.	30
3.2.1.2 <i>Salmonella</i> spp.	31
3.2.1.3 <i>Escherichia coli</i>	31
3.2.2 Keimzahlbestimmung	31
3.2.3 Zellzählung	32
3.3 Molekularbiologische Methoden	32
3.3.1 Präparation von DNS aus Kottupferproben	32
3.3.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR)	33
3.3.2.1 Monoplex-PCR zum Nachweis von Brachyspiren	33

3.3.2.2	Monoplex-PCR zum Nachweis von <i>Lawsonia intracellularis</i>	33
3.3.2.3	Duplex-PCRs zur Charakterisierung kultivierter schwach hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp. bis zur Speziesebene	33
3.3.2.4	Bosworth-PCR zum Nachweis von Virulenzgenen bei hämolysierenden <i>E. coli</i>	33
3.3.3	Primer.....	34
3.3.4	Agarosegelelektrophorese	37
3.3.5	Spezifität und Sensitivität der Monoplex-PCRs zum Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren.....	37
3.3.6	Spezifität der Duplex-PCRs zur Speziesbestimmung schwach hämolysierender Brachyspiren.....	37
3.4	Datenhaltung und Auswertung.....	38
3.4.1	Bilddokumentation	38
3.4.2	Statistische Datenauswertung	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Etablierung der Mono- und Duplex-PCRs zur Identifizierung schwach hämolysierender Brachyspiren	39
4.1.1	Spezifität und Sensitivität der Monoplex-PCRs	39
4.1.2	Spezifität und Sensitivität der Duplex-PCRs	39
4.2	Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren bei Schweinen aus nordhessischen Mastbeständen	41
4.2.1	Individuelle Auswertung der Untersuchungen (Sammelkotproben)	42
4.2.1.1	Durch kulturelle Anzucht nachgewiesene Anzahl <i>Brachyspira</i> spp.-positiver Proben.....	42
4.2.1.2	Mittels PCR-Verfahren ermittelte Anzahl <i>Brachyspira</i> spp.-positiver Proben.....	43
4.2.1.3	Gesamtzahl der mittels kultureller Anzucht und PCR-Verfahren identifizierten <i>Brachyspira</i> spp.-positiven Proben	43
4.2.1.4	Differenzierung von Mono- und Mischinfektionen mit verschiedenen <i>Brachyspira</i> spp.	44
4.2.2	Auswertung der Untersuchungen auf Betriebsebene	45
4.2.2.1	Durch kulturelle Anzucht erfasste Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-positiven Schweinen	45
4.2.2.2	Mittels PCR-Verfahren erfasste Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-positiven Schweinen	46
4.2.2.3	Gesamtzahl der Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-positiven Schweinen	46
4.2.2.4	Einzel- und Mehrfach-Nachweise von verschiedenen <i>Brachyspira</i> spp. auf Betriebsebene	47
4.2.3	Einfluss von betrieblichen Managementfaktoren (Herkunft der Tiere, Belegungsverfahren, Betriebsgröße, Tierhaltung) auf das Vorkommen von schwach hämolysierenden Brachyspiren in den Betrieben	48
4.2.3.1	Herkunft der Tiere.....	48
4.2.3.2	Belegungsverfahren.....	49
4.2.3.3	Betriebsgröße	50
4.2.3.4	Tierhaltung	51

4.3	Vergleichende Analyse der Nachweisraten schwach-hämolysierender Brachyspiren bei Schweinen mit und ohne Diarrhoe.....	52
4.3.1	Auswertung der Sammelkotproben.....	52
4.3.1.1	Einzel- und Mehrfachnachweise von verschiedenen <i>Brachyspira</i> spp.	53
4.3.2	Auswertung der Untersuchungen auf Betriebsebene	54
4.3.2.1	Einzel- und Mehrfachnachweise von verschiedenen <i>Brachyspira</i> spp.	55
4.3.3	Differentialdiagnostisch-mikrobiologische Untersuchungen in Betrieben mit durchfallkranken Tieren	56
5	Diskussion	58
6	Zusammenfassung	67
	Summary	69
7	Literaturverzeichnis.....	71
8	Anhang	84
9	Abbildungsverzeichnis.....	86
9.1	Abbildungen.....	86
9.2	Tabellen.....	86
	Danksagung	88

Verzeichnis der Abkürzungen

ad	auffüllen auf	min	Minute
A. dest.	Aqua destillata	ml	Milliliter
<i>B.</i>	<i>Brachyspira</i>	mM	Millimolar
BHI	brain-heart-infusion (Nährmedium)	MS	Massenspektrometrie
BHIF	brain-heart-infusion (Nährbouillon) mit 20 % FKS	NaCl	Natriumchlorid
bp	Basenpaare	µg	Mikrogramm
bzw.	beziehungsweise	µl	Mikroliter
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>	µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius	n	Stichprobenumfang
ca.	circa	PCR(s)	Polymerase-Chain-Reaction(s) (Polymerase-Kettenreaktionen)
cm	Zentimeter	PCV2	Porcines Circovirus Typ 2
CVSSR	Colistin, Vancomycin, Spectinomycin, Spiramycin, Rifampicin	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
d	Tag	PIS	porcine intestinale Spirochätose
DE	Diatomaceous Earth	RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
d.h.	das heißt	RT	Raumtemperatur
DNS	Desoxyribonukleinsäure	sec	Sekunde
Dr.	Doktor	SiO ₂	Siliciumoxid
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	spp.	Spezies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	s.u.	siehe unten
Fa.	Firma	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
FKS	Fötales Kälberserum	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
g	Gramm	TSA	Tryptikase-Soja-Agar
GuSCN	Guanidinthiocyanat	U	Unit
h	Stunde	u.a.	unter anderem
HCl	Salzsäure	u.U.	unter Umständen
HIT	Herkunfts- und Informationssystem für Tiere	UV	ultraviolett
H ₂ S	Schwefelwasserstoff	V	Volt
incl.	inklusive	WBE ₅₀	wachstumsbildende Einheiten 50
KbE	koloniebildende Einheit	w/v	Gewicht zu Volumen
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien	z.B.	zum Beispiel
<i>L.</i>	<i>Lawsonia</i>	z.T.	zum Teil
log	Logarithmus		
M	Molar		
MgCl ₂	Magnesiumchlorid		

1 Einleitung

Die Familie der Brachyspiraceae, die zur Ordnung der Spirochaetales zählt, beinhaltet derzeit acht verschiedene *Brachyspira* (B.)-Spezies. Hierzu gehören *B. aalborgii*, und *B. alvinipulli* bei Mensch bzw. Huhn und die beim Schwein und zum Teil bei anderen Tieren vorkommenden Spezies *B. hyodysenteriae*, *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii*, *B. pilosicoli* und *B. suanatina*.

B. hyodysenteriae, der Erreger der Schweinedysenterie (SD), grenzt sich bei der Kultivierung auf bluthaltigen Nährböden durch die Ausbildung einer vollständigen Hämolyse von den anderen oben angeführten *Brachyspira* spp. ab. Diese verursachen mit Ausnahme von *B. suanatina* lediglich eine unvollständige Hämolyse. Die SD ist eine in ihrer Ätiologie, Klinik und den pathologisch-anatomischen Befunden gut charakterisierte Krankheit. Es dominieren schleimig-blutiger Durchfall und Gewichtsabnahmen. Gelegentlich treten auch Todesfälle auf. Weltweit resultieren daraus große wirtschaftliche Verluste (Hampson et al, 1997; Taylor und Alexander, 1971). Auch *B. pilosicoli* gehört zu den Brachyspiren, für die eine charakteristische Klinik, die porcine intestinale Spirochätose, bekannt ist. Die Spirochätendiarrhoe ähnelt durch Symptome wie Durchfall und reduzierte Gewichtszunahme zwar der Dysenterie, sie weist jedoch einen weitaus mildereren Verlauf auf (Girard et al., 1995; Taylor, 1992; Trott et al., 1996c). Die weiteren beim Schwein vorkommenden schwach hämolysierenden *B. spp.* sind dagegen hinsichtlich ihrer Bedeutung als Krankheitserreger für das Schwein nur sehr schwer zu beurteilen, da sie sowohl von gesunden als auch durchfallkranken Tieren isoliert wurden (Komarek et al., 2009). Auch eine überschaubare Anzahl von Infektionsversuchen mit *B. intermedia*, *innocens* und *murdochii* Isolaten von durchfallkranken Schweinen ergaben keine eindeutigen Ergebnisse zur Bewertung der Pathogenität dieser Spezies (Jensen et al., 2000; Jensen und Boye, 2006; Weissenböck et al., 2005). Was für ihre Bedeutung als Krankheitserreger zutrifft, gilt auch für die Frage nach ihrer Verbreitung. Hier ist auch *B. pilosicoli* mit einzubeziehen. Die unterschiedlichen Angaben im Schrifttum zeichnen kein einheitliches und vor allen Dingen kein sehr repräsentatives Bild. Die meisten Studien im In- und Ausland beruhen auf stark selektierten Proben und sind in Anbetracht divergierender Untersuchungstechniken kaum miteinander vergleichbar. Diese somit sehr unbefriedigende Situation auf die Frage nach der Verbreitung und möglichen klinischen Bedeutung schwach hämolysierender Brachyspiren beim Schwein lieferte den Hintergrund für die vorliegende Arbeit

Der Schwerpunkt der geplanten Studien zielte auf die Gewinnung von Daten ab, die geeignet sind, eine klare Aussage hinsichtlich der Prävalenz schwach hämolysierender Brachyspiren beim Schwein wiederzugeben. Entsprechend waren im Hinblick auf die Herkunft und Zahl

der zu untersuchenden Proben, den statistischen Forderungen nach einem randomisierten und statistisch aussagefähigem Untersuchungsgut Rechnung zu tragen. Als weiterer Garant für möglichst wahrheitsnahe Daten dienten Untersuchungstechniken, die für sich allein oder in Kombination einen sehr sensitiven Nachweis der schwach hämolysierenden Brachyspiren ermöglichten. Abschließend sollten zudem statistisch verwertbare Zusammenhänge zwischen den zu erhebenden Informationen zum Vorliegen von Durchfall bei den beprobten Schweinen und den einzelnen Untersuchungsergebnissen ermittelt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Definition der schwach hämolysierenden Brachyspiren

Brachyspiren repräsentieren das einzige Genus der Familie der Brachyspiraceae und zeichnen sich durch eine lange (0,2-0,4 x 6-9 µm) spiralige Form aus. Ihre starke Beweglichkeit erlangen sie aufgrund von periplasmatisch gelegenen Endoflagellen (Taylor und Alexander, 1971). Sie wachsen strikt anaerob, sind aber auf Grund ihrer NADH-Oxidase-Aktivität aerotolerant (Stanton, 2006). Auf bluthaltigen Nährböden werden Brachyspirenspezies mit starker und mit schwacher Hämolyse unterschieden. Schwach hämolysierende Brachyspiren lysieren die einzelnen Erythrozyten zwar auch vollständig, jedoch ist hiervon nur ein weitaus geringerer Anteil der Erythrozyten betroffen als bei den stark hämolysierenden Brachyspiren (**Abbildung 1**) (Feltrup et al., 1999; Rasbäck et al., 2007a). Die schwache Hämolyse von Brachyspiren grenzt sich somit von der sogenannten unvollständigen oder auch vergrünenden Hämolyse z.B. von *Streptococcus pneumoniae* ab, bei der das Hämoglobin in den Erythrozyten nicht abgebaut, sondern zu dem Derivat Methämoglobin oxidiert wird und zu dem Vergrünungseffekt führt (Rolle und Mayr, 2007).

2.2 Diagnostik und Speziesdifferenzierung von Brachyspiren

Zur Identifizierung und Differenzierung von Brachyspiren können sowohl kulturell-biochemische und proteinanalytische (phänotypische) wie auch molekularbiologische (genotypische) Methoden angewendet werden.

2.2.1 Kultureller Nachweis von Brachyspiren

Brachyspiren sind Bakterien, die sich nur langsam vermehren. Für die Anzucht stehen flüssige (z.B. Brain-Heart-Infusion-Bouillon mit FKS-Zusatz [BHIF]) und feste Nährmedien zur Verfügung. Als feste Nährmedien kommen Trypticase-Soja-Agar (TSA), Brain-Heart-Infusion-Agar (BHI), Diagnostic Sensitivity Test Agar (DST) oder Columbia Agar zum Einsatz, denen Pferde-, Rinder- oder Schafblut (5 bis 10 %) zugesetzt wird (Calderaro et al., 2005; Feltrup et al., 1999; Verspohl et al., 2001). Durch Zugabe von Antibiotika (Spiramycin, Rifampicin, Spectinomycin, Vancomycin, Colistin) wird das Wachstum der Begleitflora gehemmt (Calderaro et al., 2005; Kunkle und Kinyon, 1988; Verspohl et al., 2001). Die Inkubationszeiten variieren je nach Studie zwischen drei und zehn Tagen (Fellstrom et al., 1999; Feltrup et al., 1999; Hommez et al., 1998; Verspohl et al., 2001) und die gewählten Inkubationstemperaturen zwischen 37 °C und 42 °C (Barcellos et al., 2000a; Feltrup et al., 1999; Hommez et al., 1998; Verspohl et al., 2001). *B. hyodysenteriae* und *B. suanatina* weisen bei Kultivierung auf Nährböden mit Zusatz von Blut eine starke, alle übrigen sechs Spezies (*B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii*, *B. pilosicoli*, *B. aalborgii* und *B. alvinipulli*) dagegen eine

schwache Hämolyse auf (Feltrup et al., 1999; Rasbäck et al., 2007a). In jüngster Zeit wurden allerdings vereinzelt *B. pilosicoli*- und *B. intermedia*-Isolate beschrieben, die eine starke Hämolyse auf TSA besitzen, wie auch *B. hyodysenteriae*-Isolate mit einer schwachen Hämolyse (Burrough et al., 2012a; Clothier et al., 2011). Die ca. 1 mm großen hämolysierenden Kolonien sind durch eine graue konvexe und raue Oberfläche gekennzeichnet (Tasu et al., 2004; Trivett-Moore et al., 1998; Verspohl et al., 2001).

In den letzten Jahren konnte durch Optimierung der Nährmedien und Anzuchtbedingungen die Nachweisgrenze für Brachyspiren in der kulturellen Anzucht deutlich gesenkt werden. Von ersten Untersuchungen, bei denen eine Grenze von 1×10^9 KbE/g Kot angegeben wurden (Kunkle und Kinyon, 1988), konnte diese auf 5×10^2 KbE/g Kot (Calderaro et al., 2005) bzw. $1,4 \times 10^2$ KbE/g Kot, selbst nach einer dreiwöchigen Aufbewahrung der Kotproben in Amies Medium (Fellstrom et al., 2001b), gesenkt werden.

Versuche die Nachweisgrenze noch weiter zu verringern, indem eine immunmagnetische Anreicherung der Spirochäten der kulturellen Anzucht vorgeschaltet wurde, waren aber nicht erfolgreich (Corona-Barrera et al., 2004). Anscheinend wurden während der notwendigen Waschschrte viele Brachyspiren-Zellen von den magnetischen Beads wieder abgelöst.

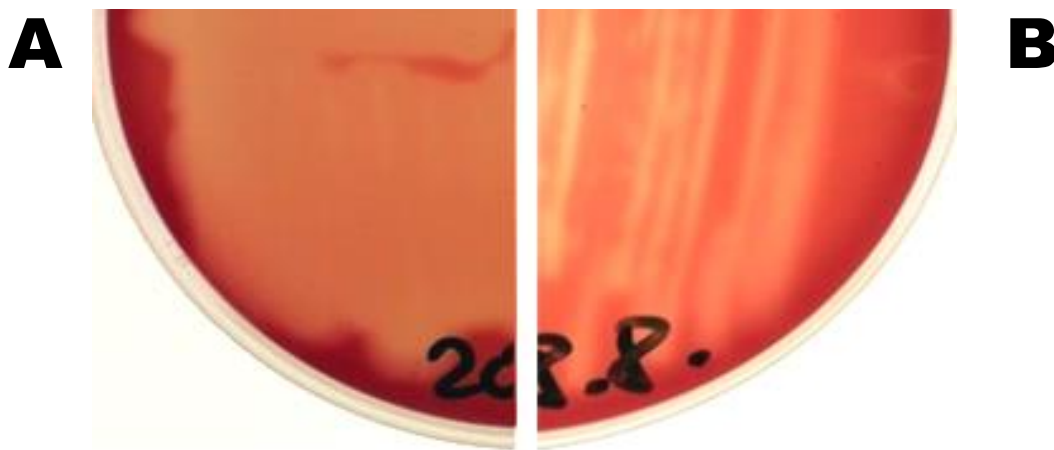


Abbildung 1: Vergleich der starken (A) und schwachen (B) Hämolyse bei Brachyspiren nach 5-tägiger Anzucht auf TSA^{CVSSR}-Agar bei 37 °C.
Bild: Dr. Werner Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen.

2.2.2 Biochemische Methoden zur Speziesdifferenzierung von Brachyspiren

Nach erfolgreicher kultureller Anzucht und Reinkultivierung wurden porcine Isolate anhand ihrer Fähigkeit zur Indolbildung, Hippuratspaltung, sowie der α -Galaktosidase- und der α -

und β -Glukosidase-Aktivität differenziert (**Tabelle 1**) (Fellstrom et al., 1997; Feltrup et al., 1999; Stanton et al., 1997). Allerdings lassen sich nicht alle Brachyspirenspezies untereinander sicher differenzieren. *B. hyodysenteriae* ist beispielsweise nicht in jedem Fall allein durch biochemischen Eigenschaften von anderen Brachyspirenspezies zu unterscheiden (Feltrup et al., 1999; La et al., 2003; Stanton et al., 1997). Die Intensität der Hämolyse ist daher in solchen Fällen entscheidend (Stanton et al., 1997), jedoch auch nicht immer eindeutig einer starken oder schwachen Form zuzuordnen (Rohde et al., 2002). Mitunter ist auch eine Speziesdifferenzierung nicht möglich, da Stämme bzw. Isolate auftreten können, die eine Ausnahme hinsichtlich ihrer biochemischen Reaktion darstellen (Ohya et al., 2008) wie beispielsweise α -Galaktosidase positive Stämme mit starker Hämolyse (Feltrup et al., 1999) oder Hippurat-negative *B. pilosicoli*-Stämme (Fossi et al., 2004). Hinzu kommt, dass die Nachweisrate der Indolbildung abhängig ist von der angewendeten Methode (Feltrup et al., 1999). Ebenso sind beim Auftreten von Mischinfektionen mit verschiedenen Brachyspirenspezies biochemische Testverfahren zur Differenzierung sehr ungenügend, da es häufig zu Fehlinterpretationen kommen kann (Fellstrom et al., 1996; Fellstrom et al., 2001b; Rasbäck et al., 2005). Hinzu kommt, dass die biochemische Charakterisierung im Hinblick auf den Einsatz in der Routinediagnostik sehr zeit- und arbeitsintensiv ist und das Vorhandensein vitaler Brachyspiren Voraussetzung ist (Fellstrom et al., 1997; Feltrup et al., 1999).

Tabelle 1 Differenzierung porciner Brachyspiren anhand kulturell-biochemischer Merkmale [modifiziert nach (Fellstrom und Gunnarsson, 1995; Feltrup et al., 1999; Rasbäck et al., 2007a; Stanton et al., 1997)].

Spezies	biochemische Gruppe	Hämolyse	Biochemische Reaktion ¹⁾				
			Indol.	Hipp.	α -Gal.	α -Glu.	β -Glu.
<i>B. hyodysenteriae</i>	I	stark	-/+	-	-	-/+	+
<i>B. suanatina</i>	I	stark	(+)	-	-	n. b.	+
<i>B. pilosicoli</i>	IV	schwach	-/+	+	-/+	-/+	-/+
<i>B. intermedia</i>	II	schwach	+	-	-	+	+
<i>B. innocens</i>	III	schwach	-	-	+	-/+	-/+
<i>B. murdochii</i>	III	schwach	-	-	-	-/+	+

Erläuterung: **1) Indol.:** Indolbildung, **Hipp.:** Hippurathydrolyse, **α -Gal.:** α -Galaktosidase, **α -Glu.:** α -Glukosidase, **β -Glu.:** β -Glukosidase;
 + = positiv; (+) = schwach positiv; - = negativ; -/+ = Reaktion nicht einheitlich, da einzelne Stämme einer Spezies positiv, andere negativ sind;
 n. b. = nicht beschrieben.

2.2.3 Proteinanalytische Analysen mittels MALDI-TOF MS zur Speziesdifferenzierung von Brachyspiren

Neuere Untersuchungen überprüfen, in wie weit der Einsatz von **MALDI-TOF MS** (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) geeignet ist eine Speziesdifferenzierung vorzunehmen (Calderaro et al., 2013; Prohaska et al., 2014; Randall et al., 2011). Hierbei werden massenspektrometrisch die Proteinprofile der verschiedenen Spezies erhoben und mit den Proteinprofilen einer Datenbank verglichen. Calderaro et al. (2013) untersuchten 56 Feldisolat und verglichen sie mit den Proteinprofilen von Referenzstämmen. Nur bei zwei Feldisolaten wich das Ergebnis der MALDI-TOF MS-Analyse von den Ergebnissen einer vorhergegangenen genotypischen Untersuchung ab. In einer anderen Studie zeigte sich aber, dass *B. murdochii* und *B. innocens* nur zum Teil differenzierbar waren, da sehr ähnliche Proteinprofile erzeugt wurden (Prohaska et al., 2014).

2.2.4 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis und zur Differenzierung von *Brachyspira* spp.

Es existiert eine Reihe von Verfahren, mit denen Brachyspiren genetisch nachgewiesen und die Spezies bestimmt werden können. Allerdings haben Studien auch gezeigt, dass es nicht immer zu übereinstimmenden Ergebnissen bei Vergleich der Speziesbestimmung mit biochemischen und mit molekularbiologischen Methoden kommt (Atyeo et al., 1998; Feberwee et al., 2008; Komarek et al., 2009; Rasbäck et al., 2006).

Für eine Bestimmung mittels **Polymerasekettenreaktion (PCR)** stehen genus- bzw. speziesspezifische Primer zur Verfügung (Atyeo et al., 1999; Herbst et al., 2004; La et al., 2003; Weissenböck et al., 2005). Zielgen beim Nachweis von *B. intermedia*, *B. innocens* und *B. murdochii* ist überwiegend das *nox*-Gen und für *B. pilosicoli* der 16S rRNS kodierende Abschnitt der chromosomalen DNS (De Arriba et al., 2002; La et al., 2003; Muniappa et al., 1997; Park et al., 1995; Phillips et al., 2006) (siehe **Tabelle 2**). Die Sensitivität dieser speziesspezifischen-PCRs wird mit 10^2 Zellen/g Kot angegeben (Rasbäck et al., 2005). Bei der Anwendung einer Realtime-PCR kann zusätzlich zur jeweiligen Bakterienspezies auch die Quantität des Zielgens bestimmt werden.

Neben Monoplex-PCR-Verfahren kommen auch Multiplex-PCRs zum Einsatz, bei denen zwei oder mehrere Spezies gleichzeitig detektiert werden können. Dies ermöglicht in der Routinediagnostik die Bearbeitungszeit zu verkürzen und Kosten einzusparen. Allerdings bedarf es meist einer aufwendigeren Optimierung des Tests (Willems und Reiner, 2010). In der Literatur sind Nachweisgrenzen für real-time-Multiplex-PCRs von $500 - 8 \times 10^3$ Zellen/g Kot (Song und Hampson, 2009; Willems und Reiner, 2010) und für Multiplex-PCRs von $10^2 - 10^3$ Zellen/g Kot beschrieben (La et al., 2006; Nathues et al., 2007).

Tabelle 2 Publierte Primer zum PCR-Nachweis schwach hämolysierender *Brachyspira* spp.

B. Spezies	Gen	Sequenz (5' → 3')	Position¹⁾	Acc.-Nr. [NCBI]:	Amplikon [bp]	Referenz(en)⁴⁾
<i>pilosicoli</i>	16S rRNS	AGAGGAAAGTTTTTTCGCTTC TACGGCTACCTTGTTACGACTTA	1456-1477 <u>193-213</u>	NR_075069	2209	Park et al. (1995); Alyeo et al. (1998).
	16S rRNS	AGAGGAAAGTTTTTTCGCTTC ²⁾ GCACCTATGTTAAACGTCCTTG	165-185 <u>964-985</u>	JF430726	821	La et al. (2003); Lim et al. (2012); Phillips et al. (2006); Rasbäck et al. (2005).
	16S rRNS	AGAGGAAAGTTTTTTCGCTTC ²⁾ TCCGCCCTACTCACCCCTTAC	165-185 <u>506-525</u>	JF430726	361	Muniappa et al. (1997); Barcellos et al. (2000a); Carvajal et al. (2006); De Arriba et al. (2002); Osorio et al. (2010).
	16S rRNS	CATAAGTAGAGTAGAGGAAAGTTTT CTGTTGCTACCGAGTAATGTCGAG	153-178 <u>1055-1079</u>	JF430726	927	Fellstrom et al. (1997).
	16S rRNS	AAGTAGAGTAGAGGAAAGTTTT CTCGACATTACTCGGTAGCAACAG	156-178 <u>1056-1079</u>	JF430726	924	Fellstrom et al. (1997); Calderaro et al. (2005); Choi et al. (2002); Rasbäck et al. (2005); Rasbäck et al. (2006); Rasbäck et al. (2007a).
	23S rRNS	AGGTGATGGTTATCCTCG TTAGAAATAATTCCTAAGGTT	1330-1348 <u>1451-1471</u>	U72703	142	Leser et al. (1997); De Arriba et al. (2002); Osorio et al. (2010).
	nox	CTAACAAAAAATGACTG GAGATTTAGAAGAAACAAG	438784-438801 <u>439417-439434</u>	CP002873	651	Alyeo et al. (1998); Merialdi et al. (2003).
	nox	TGAAATCTTCTAAAAGATGAG TAGCTAAAGCAATATATTCA	439360-439379 <u>439436-439456</u>	CP002873	96	Weissenböck et al. (2005); Komarek et al. (2009); Ohya et al. (2008).
	nox	GAAGCTATGCCCTAGAGTTATGGCTAAC CCTAAATGCAATTCTATACCGCATC	439089-439115 <u>439161-439186</u>	CP002873	98	Willems und Reiner (2010).
	nox	TATTCTTGTTCTTCTAAATCTATG TGAGCACCTAATAATCTTCCAG	439413-439433 <u>439705-439726</u>	CP002873	314	Willems und Reiner (2010).

Fortsetzung der Tabelle 2 und Erläuterungen auf der nächsten Seite

B. Spezies	Gen	Sequenz (5' → 3')	Position ¹⁾	Acc.-Nr. [NCBI]:	Amplikon [bp]	Referenz(en) ⁴⁾
Fortsetzung Tabelle 2						
<i>inter-media</i>	<i>nox</i>	TTGCCTAGAGTTATGGGTAAT GACATAAAGTACCATATCTACT	537-557 <u>698-718</u>	AF060812	182	Weissenböck et al. (2005) ; Komarek et al. (2009); Ohya et al. (2008).
	<i>nox</i>	AGAGTTTGA(A/T)GA(C/T)A(C/A)TTATGAC ³⁾ ATAAACATCAGGATCTTTGC	266-288 <u>793-811</u>	AF060812	546	Phillips et al. (2006) ; Phillips et al. (2010).
	<i>nox</i>	GTCCTGAAAGCTTAAAAA CTAATAAACGTCCTCAG(TAT) ³⁾	157-174 <u>1144-1161</u>	AF060812	1005	Atyeo et al. (1998) ; Calderaro et al. (2005); Lim et al. (2012); Rasbäck et al. (2007a).
23S rRNS		CCGTTGAAGGTTTACCGTG CGCCTGACAAATGTCCGG	1308-1326 <u>2317-2333</u>	NP_103021	1027	Leser et al. (1997) ; De Arriba et al., 2002; Rasbäck et al. (2005); Rasbäck et al. (2007a).
<i>inno-cens</i>	<i>nox</i>	ATGGTGCTATAAAAAGTAGAC ACCAACCCAGTAGAAGCCATG	778-797 <u>1007-1026</u>	AF060805	249	Weissenböck et al. (2005) ; Komarek et al. (2009); Ohya et al. (2008).
<i>mur-dochii</i>	<i>nox</i>	GAATACTGCGGTACTCAAGGA GAGAAATGCGTGAATAGCTTCG	956-976 <u>1195-1215</u>	AF060813	260	Weissenböck et al. (2005) ; Clothier et al. (2011); Komarek et al. (2009); Ohya et al. (2008).
<i>inno-cens / mur-dochii</i>	<i>nox</i>	CCTGAAAGTTTAAAAGCTG CGATGTATTCTTCTTTTCC	162-180 <u>873-892</u>	AF060805	731	Atyeo et al. (1998) ; Calderaro et al. (2005); Lim et al. (2012)
			161-179 <u>872-891</u>	AF060813		

Erläuterungen: **1)** Die Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der NCBI-Datenbank, die Positionen der Gegenstrang-
primer sind unterstrichen dargestellt; **2)** Vorwärtsprimer von Park und Kollegen (1995) übernommen, Rückwärtsprimer in der
genannten Arbeit entwickelt; **3)** Angaben in () stellen Modifikationen von späteren Publikationen dar; **4)** in Fettdruck ist die jeweils
originäre Referenz gekennzeichnet, es folgen weitere Publikationen, in denen ebenfalls die PCR eingesetzt wurde.

Bei der Methodik der **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)**-Analyse wird DNS mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Als Ausgangsmaterial kann entweder die komplette genomische DNS eingesetzt werden (Coombs et al., 1989) oder es wird aus einem bestimmten Zielgen zunächst ein DNS-Fragment mittels PCR amplifiziert und anschließend das PCR-Amplifikat verdaut (**PCR-RFLP**) (Barcellos et al., 2000a; Fisher et al., 1997; Kim und Lee, 2006; Rohde und Habighorst-Blome, 2012; Rohde et al., 2002; Stanton et al., 1997; Townsend et al., 2005). Zur Differenzierung von *Brachyspira*-Spezies werden überwiegend PCR-RFLP-Assays durchgeführt, wobei je nach Autor unterschiedliche Zielgene und Restriktionsendonukleasen verwendet werden (**Tabelle 3**). Je nach Methode unterscheiden sich allerdings die Restriktionsmuster jedoch nicht so voneinander, dass eine eindeutige Identifizierung einer Spezies möglich ist (Barcellos et al., 2000a; Kim und Lee, 2006). So kann mit den Restriktionsendonukleasen *Hinfl*, *Sau3A*, *TaqI* bei der 16S rRNS PCR-RFLP-Analyse nicht zwischen *B. hyodysenteriae* und *B. intermedia* unterschieden werden (Stanton et al., 1997). Oder bei der 23S rRNS PCR-RFLP-Analyse lassen sich die schwach hämolysierenden *B. spp.* nicht abgrenzen (Barcellos et al., 2000a; Kim und Lee, 2006).

Tabelle 3 Publierte PCR-RFLP-Analysen zur Identifikation von *Brachyspira* spp.

Zielgen	Restriktions- endonukleasen	Referenz(en)
16S rRNS	<i>Hinfl</i> , <i>Sau3A</i> , <i>TaqI</i>	Stanton et al. (1997)
23S rRNS	<i>TaqI</i> , <i>AluI</i>	Barcellos et al. (2000a); Kim und Lee (2006)
<i>flaA1</i>	<i>EcoRV</i>	Fisher et al. (1997)
<i>nox</i>	<i>MboI</i> (ehem. <i>DpnII</i>), <i>SfiI</i> (ehem. <i>BfmI</i>)	Rohde und Habighorst-Blome (2012); Rohde et al. (2002); Townsend et al. (2005)

Mit der **Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)** kann RNS bzw. DNS direkt im jeweiligen Gewebe (*in situ*) nachgewiesen werden. Sie unterscheidet sich somit von anderen *in vitro*-Nachweismethoden. Bei diesem Verfahren können die *Brachyspira* somit auch z.B. direkt mit im Darm vorhandenen Läsionen in Verbindung gebracht werden und es kann eine Aussage hinsichtlich der Intensität und Lokalisation der Infektion und der Verteilung der Erreger im Gewebe gemacht werden (Herzog et al., 2005; Jensen, 2009; Jensen und Boye, 2005; Jensen et al., 2010). Durch Verwendung von RNS-spezifischen Sonden ist es zudem möglich, die Transkriptionsrate einzelner Gene an den jeweiligen Lokalisationen der Bakterien zu ermitteln, was Rückschlüsse auf deren Funktion, z.B. den Nachweis einer gesteigerten Expression

während der Invasion in Gewebe, ermöglicht. Während die Spezifität des Verfahrens hoch ist, ist die Sensitivität verglichen mit dem kulturellen Anzuchtverfahren niedriger (Waldmann et al., 2000). Dies beruht darauf, dass bei einer geringen Anzahl Bakterienzellen bzw. einer zu geringen Menge RNS in den Zellen (z.B. durch bereits einsetzende Autolyse) die Signalintensität der Detektion unter der Nachweisgrenze bleibt und der Test so ein negatives Ergebnis bringt (Herzog et al., 2005; Jensen, 2009; Waldmann et al., 2000). Somit ist entscheidend, wie intakt die Bakterien zum Zeitpunkt der Fixierung der Gewebeproben sind (Boye et al., 1998). Zudem kann sich vorhandener Mucus an der Schleimhautoberfläche und in den Krypten negativ auf die Hybridisierung auswirken (Herzog et al., 2005). Allerdings konnte mit diesem Verfahren gezeigt werden, dass *B. spp.* vor allem an der Schleimhautoberfläche und in den Kryptenlumina vorliegen. Daneben sind sie auch im Becherzelllumen zu finden und invadieren sogar in den interzellulären Spalten entlang der lateralen Zellmembranen bis zur *Lamina propria mucosae*, bei stark befallenen Darmabschnitten mitunter auch in die *Lamina propria mucosae* des Dickdarms (Herzog et al., 2005; Jensen, 2009; Jensen und Boye, 2005; Jensen et al., 2010; Weissenböck et al., 2005). Obwohl dieses Verfahren eine hohe Spezifität für den Nachweis von Brachyspiren aufweist, wird es aufgrund der Anfälligkeit gegenüber Nukleinsäuredegradierung und der relativ teuren und schwierig standardisierbaren Testdurchführung und -auswertung kaum zu Routinezwecken eingesetzt.

Weitere molekularbiologische Methoden, die zur Speziescharakterisierung eingesetzt werden, sind: **Gensequenzierung** (De Smet et al., 1998; Leser et al., 1997), **Multilokussequenztypisierung (MLST)** (La et al., 2009; Phillips et al., 2010; Rasbäck et al., 2007b), **Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)** (Atyeo et al., 1996; Atyeo et al., 1999; Fellstrom et al., 1999; Suriyaarachchi et al., 2000), **Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE)** (Lee und Hampson, 1994; Lee et al., 1993; Stanton et al., 1996), „**random amplified polymorphic DNA**“ (**RAPD**) (Fellstrom et al., 2008) und **Restriktionsendonukleaseanalyse (REA)** (Combs et al., 1992; Harel et al., 1994). Diese Methoden sind in ihren Durchführungen aufwendig und kommen daher nur bei epidemiologischen Untersuchungen oder bei Fragestellungen bezüglich genetischer Diversität oder der Verwandtschaft von Brachyspiren-Isolaten zum Einsatz (Rasbäck et al., 2007b; Suriyaarachchi et al., 2000). Einen Überblick über die verschiedenen Untersuchungsverfahren und deren Anwendung gibt die Arbeit von Schneider (2014).

2.3 Pathogenese, klinische Bedeutung und Prävalenz von *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens* und *B. murdochii*

2.3.1 *Brachyspira pilosicoli*

B. pilosicoli ist der Erreger der porcinen Intestinalen Spirochätose (PIS) (Thomson et al., 1997; Trott et al., 1996b) und der intestinalen Spirochätose beim Menschen (Lee und Hampson, 1994). Nach oraler Infektion adhären die Spirochäten in sehr hoher Zahl an die Epithelzellen des Dickdarms. Hierdurch entsteht der Eindruck vom Vorhandensein eines zusätzlichen, sogenannten falschen Bürstensaums (Girard et al., 1995; Spearman et al., 1988; Taylor et al., 1980).

Spirochäten sind in visköser Umgebung beweglich. Die Chemotaxis zu Mucin ist ein wichtiger erster Schritt in der Pathogenese (Milner und Sellwood, 1994). Mucin ist der Hauptbestandteil des Kolonschleims und wird hauptsächlich aus Glykoproteinen gebildet, die wiederum *in vitro* als Substrat für Wachstum und Chemotaxis von *B. pilosicoli* dienen können (Marshall und Allen, 1978; Witters und Duhamel, 1999). *In vitro*-Versuche haben gezeigt, dass die maximale Chemotaxis von *B. pilosicoli*-Stämmen bei einer Mucinkonzentration von 6 bis 8 % erreicht wird. Die für eine gerichtete Bewegung erforderliche (optimale) Konzentration kann aber beachtlich zwischen *B. pilosicoli*-Stämmen variieren. Einzelne *B. pilosicoli*-Stämme unterscheiden sich zudem in ihrer Beweglichkeit. Es gibt jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit eines Stammes und seiner Fähigkeit Mucinschichten zu durchdringen (Naresh und Hampson, 2010). *In vivo* dagegen scheinen für eine erfolgreiche Kolonisation und für das Auslösen klinischer Symptome beide Faktoren, die Beweglichkeit des Erregers und die Chemotaxis zum Mucin, notwendig zu sein (Naresh und Hampson, 2010). So demonstrierten *in vitro*-Versuche an CACO-2-Zellen, dass sich *B. pilosicoli* zunächst im Bereich der „tight junctions“ an das Darmepithel anheftet. Auch hier scheint die Fähigkeit verschiedener *B. pilosicoli*-Stämme überhaupt an Zellen zu binden stammspezifisch ausgebildet zu sein. Mit fortschreitender Zeit besiedeln die Spirochäten dann die restliche Zelloberfläche. Werden Zellen mit *B. pilosicoli* inokuliert, so unterliegen sie einer Reihe von Veränderungen. Dazu gehören die Akkumulation von Aktin an den „tight junctions“, Verlust der „tight junctions“, Zerstörung der Zellmembran, Apoptose und die Hochregulation der Expression der Zytokine IL-1 β und IL-8. Die anfängliche Lokalisation im Bereich der „tight junctions“ scheint das Durchdringen der Epithelschicht zu erleichtern und könnte auch der Weg sein, wie die Spirochäten durch das Kolonepithel in den Blutstrom gelangen (Naresh et al., 2009). Bakteriämien mit *B. pilosicoli* sind bisher allerdings nur selten beim Menschen beschrieben worden (Kanavaki et al., 2002; Prim et al., 2011; Zeeshan et al., 2009).

In Folge einer Infektion kann bei den betroffenen Schweinen eine katarrhalische, erosive bis ulzerative Kolitis auftreten. Die Schleimhaut erscheint dann verdickt und ödematös, die mit

Schleim und Zelldetritus gefüllten Krypten sind dilatiert und verlängert (Hampson und Duhamel, 2006). Sichtbar werden Becherzellhyperplasien, eine Invasion der Brachyspiren bis in die *Lamina propria mucosae*, sowie eine Infiltration der Submukosa mit mononukleären Zellen (Jensen et al., 2004; Jensen et al., 2000; Thomson et al., 1997). Der klinisch apparente Verlauf zeichnet sich durch einen wässrigen-schleimigen Durchfall aus. Wie bei der durch *B. hyodysenteriae* hervorgerufenen Dysenterie treten auch bei *B. pilosicoli*-Infektionen mitunter Fieber und eine schlechtere Futterverwertung auf, was mit einer geringeren Gewichtszunahme und einer verlängerten Mastdauer verbunden ist. Die Mortalität ist bei der PIS gering (Hampson und Duhamel, 2006; Trott et al., 1996c).

Das Vorkommen von *B. pilosicoli* bei Schweinen und damit verbundene Erkrankungen sind weltweit beschrieben (**Tabelle 4**, ab Seite 20) (Barcellos et al., 2000b; Clothier et al., 2011; Tasu et al., 2004; Trivett-Moore et al., 1998). Aus Deutschland wird von durchfallkranken Schweinen eine Prävalenz von 7,9 % berichtet und bei Tieren ohne diese Problematik von 7,3 % (Werner et al., 2011). Dies lässt im Hinblick auf die Bedeutung des Erregers im Feld keine eindeutige Interpretation zu. Prävalenzdaten zu Untersuchungen, bei denen keine Angaben zum Gesundheitsstatus der Tiere gemacht werden, belaufen sich auf Werte zwischen 0 und 4,0 % (Rothkamp et al., 2005; Verspohl et al., 2001; Willems und Reiner, 2010). Angaben zu den Herdenprävalenzen (d.h. Anteil der positiven Betriebe von allen untersuchten Betrieben) in Deutschland liegen nur vereinzelt vor und lassen aufgrund der sehr kontroversen Untersuchungsergebnisse von 2,5 % (Wendt et al., 2006) versus 31,6 % (Reiner et al., 2011a) keine sicheren Schlussfolgerungen zu. In einigen anderen mittel- und südeuropäischen Ländern werden geringe Nachweisraten für *B. pilosicoli* von 0 - 3,0 % genannt (Carvajal et al., 2006; Hommez et al., 1998; Komarek et al., 2009; Osorio et al., 2010; Plawinska et al., 2004). Im übrigen Ausland liegen die Nachweisraten höher. So wurden bis zu 9,3 % in Dänemark, 15,5 % in Südkorea, 31,7 % in Ungarn und sogar 51,8 % in England angegeben (Biksi et al., 2007; Choi et al., 2002; Jensen und Boye, 2005; Moller et al., 1998; Thomson et al., 1998). In Schweden reichen die Nachweisraten je nach Untersuchung von 0 % bis 48,0 % (Fellström et al., 1998; Fellstrom et al., 2001b; Jacobson et al., 2005; Jacobson et al., 2003; Rasbäck et al., 2004). Die Herdenprävalenzen für Südeuropa (Italien 9,5 %, Spanien 5,3 %) (Carvajal et al., 2006; Merialdi et al., 2003) und für Südkorea mit 10,1 % (Choi et al., 2002) liegen unter denen für Skandinavien mit 12,0 - 32,4 % (Heinonen et al., 2000; Moller et al., 1998; Stege et al., 2000). Aus Brasilien wird sogar von einer Herdenprävalenz von bis zu 41,2 % berichtet (Barcellos et al., 2000b).

Die zitierten Angaben basieren überwiegend auf der Untersuchung vorselektierter Proben und Anwendung unterschiedlicher diagnostischer Methoden. Die hieraus resultierende Hetero-

genität der Daten belastet den Versuch einer objektiven Stellungnahme zu Prävalenz und Bedeutung von *B. pilosicoli* beim Schwein.

Neben dem Hausschwein sind *B. pilosicoli*-Infektionen auch bei Affen (Duhamel et al., 1997), Hunden (Duhamel et al., 1998; Fellstrom et al., 2001a; Manabe et al., 2004; Oxberry und Hampson, 2003), Pferden (Hampson et al., 2006a), Wildschweinen (Phillips et al., 2009; Reiner et al., 2011b) und Vögeln (McLaren et al., 1997; Trampel et al., 1994) beschrieben. Zudem wurde *B. pilosicoli* von Mäusen und Ratten isoliert (Backhans et al., 2011; Backhans et al., 2010; Jamshidian et al., 2003; Sacco et al., 1997). Beim Geflügel ist *B. pilosicoli* Auslöser der aviären Spirochätose (Dwars et al., 1992; Hampson und Swayne, 2006; Trampel et al., 1994). Auch der Mensch kann sich mit *B. pilosicoli* infizieren und an einer intestinalen Spirochätose erkranken (Lee und Hampson, 1994; Trivett-Moore et al., 1998). Humane Infektionen treten vor allem in Ländern mit geringen hygienischen Standards auf. Homosexuelle und HIV-infizierte Personen besitzen ein höheres Risiko mit Brachyspiren infiziert zu sein (Kasbohrer et al., 1990; Law et al., 1994). Vereinzelt wurden Fälle von *B. pilosicoli*-Bakteriämien beim Menschen beschrieben (Bait-Merabet et al., 2008; Prim et al., 2011; Trott et al., 1997). *B. pilosicoli* ist somit im Gegensatz zu den anderen bei Schweinen anzutreffenden Brachyspirenspezies ein Zoonoseerreger (Hampson et al., 2006b; Trott et al., 1996b).

2.3.2 *Brachyspira intermedia*

Auf genotypischer Ebene ist *B. intermedia* am engsten mit *B. hyodysenteriae* verwandt. Referenzstämme der beiden Spezies sind mittels 16S rRNS-PCR-RFLP nicht unterscheidbar und auch bei Kreuzhybridisierungsstudien mit genomischer DNS zeigt sich eine Übereinstimmung von 57 - 68 % zwischen den Spezies (Stanton et al., 1997). Der Speziesname „*intermedia*“ nimmt Bezug auf die intermediäre Position zwischen *B. hyodysenteriae* und *B. innocens* anhand biochemischer Charakteristika (Lee et al., 1993). So besitzen *B. intermedia* und *B. hyodysenteriae* eine Anzahl phänotypischer Gemeinsamkeiten: Beide sind Indol-produzierende Spezies und besitzen α - und β -Glukosidase-Aktivität (siehe Abschnitt 2.2.2) (Fellstrom und Gunnarsson, 1995; Lee et al., 1993). Allerdings weist *B. hyodysenteriae* eine starke Hämolyse (Hampson und Duhamel, 2006) auf und unterscheidet sich so von *B. intermedia*. Wie bereits erwähnt sind jedoch in jüngster Zeit *B. intermedia*-Stämme (Speziesbestimmung mittels *nox*-Gen PCR) isoliert worden, die eine starke Hämolyse zeigten und in einem Infektionsversuch bei einem Teil der Schweine zu blutig-schleimigem Durchfall führten (Burrough et al., 2012b; Clothier et al., 2011). Allerdings wiesen diese Isolate keine 100 %-ige Übereinstimmung in den *nox*-Gensequenzen zu den Sequenzen von klassischen, schwach hämolysierenden *B. intermedia*-Isolaten auf, sondern bildeten ein eigenes Cluster, welches sich zwischen den klassischen *B. intermedia*-Isolaten und einer neuen putativen Spezies „*B. sp. SASK30446*“, die sich

ebenfalls durch eine starke Hämolyse auszeichnet, einordnete. Diese stark hämolysierenden Isolate wurden kürzlich in eine neue Spezies *B. hampsonii* eingruppiert (Burrough et al., 2013; Chander et al., 2012). Die sichere Abgrenzung von *B. intermedia* zu *B. hyodysenteriae* erfolgt somit durch molekularbiologische Untersuchungsmethoden, wie z.B. Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) (Stanton et al., 1996) oder Nukleotidsequenzanalyse des 23S rRNS- oder des *nox*-Gens (Atyeo et al., 1999).

Pathohistologische Untersuchungen an Proben von natürlich infizierten Tieren mit einer Kolitis wiesen eine Invasion von *B. intermedia* bis in die *Lamina propria mucosae* nach (Jensen and Boye, 2005). Experimentelle Infektionsstudien mit schwach hämolysierenden *B. intermedia* an Schweinen kommen dagegen hinsichtlich des pathogenen Potentials dieser Spezies zu unterschiedlichen Ergebnissen. Nach intragastraler Verabreichung an jeweils drei aufeinanderfolgenden Tagen von *B. intermedia*-Feldisolaten (5×10^9 - 10^{10} KbE/Dosis), betrug die Reisolationsrate aus dem Kot bei experimentell infizierten Läuferschweinen 20,0 %, wenn die Tiere mit Dexamethason vorbehandelt wurden und 90,0 %, wenn die Tiere vor der Inokulation Sojaschrot verfüttert bekommen hatten. *B. intermedia* wurde im Rahmen der Sektion häufiger aus dem Kolon (proximales und distales, je bei 7 bzw. 8 von 10 Ferkeln) als aus dem Zäkum (bei 4 von 10 Ferkeln) angezüchtet (Nguyen Thi, 2007). Vereinzelt wurde eine geringgradige lymphohistiozytäre Enteritis mit Kryptendilatation, Kriptenabszessen und einer Hyperämie der *Lamina propria mucosae* diagnostiziert (Nguyen Thi, 2007). Im Vergleich zu diesen experimentellen Untersuchungen an Schweinen, bei denen keine klinischen Symptome hervorgerufen werden konnten (Jensen et al., 2000; Neef et al., 1994; Nguyen Thi, 2007), ergaben Untersuchungen aus den letzten Jahren ein anderes Bild. So wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass es bei *B. intermedia* deutliche Stammunterschiede bezüglich der Virulenz von verschiedenen *B. spp.*-Isolaten (u.a. auch stark hämolysierende *B. intermedia*-Isolate) gibt. Bei den infizierten Mäusen führten stark hämolysierende *B. intermedia*-Stämme zu Läsionen, die nicht von solchen Läsionen unterscheidbar waren, die von *B. hyodysenteriae* hervorgerufen worden waren (Burrough et al., 2012a). Und auch eine experimentelle Infektion von Schweinen mit diesen untypischen stark hämolysierenden *B. intermedia*-Isolaten führte zu Durchfallerscheinungen und zu Läsionen, die vergleichbar waren mit solchen, die von *B. hyodysenteriae* hervorgerufen wurden (Burrough et al., 2012b).

Zur Beurteilung der klinischen Relevanz von *B. intermedia* liegen nur wenige Daten vor. Rothkamp et al. (2005) wiesen z. B. *B. intermedia* bei einigen durchfallkranken Schweinen als einziges Pathogen nach. Allerdings fehlten in dieser Studie Untersuchungen auf weitere Durchfallerreger wie z.B. *Lawsonia intracellularis*, PCV2 oder Parasiten. Dagegen wiesen Komarek et al. (2009) *B. intermedia* grundsätzlich nur in Kombination mit anderen darmpathogenen Keimen nach. Andere Untersuchungen erstreckten sich zwar auch auf weitere Erreger,

jedoch wurden die entsprechenden Befunde nicht in Zusammenhang mit dem Vorkommen von *B. intermedia* dargestellt (Wendt et al., 2006).

Was die Verbreitung von *B. intermedia* in deutschen Schweinebeständen betrifft, wurden bei zur Diagnostik eingesandten Kotproben ohne Angaben zum Gesundheitsstatus Nachweisraten von 0,3 % (Verspohl et al., 2001) bis 4,9 % (Rothkamp et al., 2005) ermittelt (**Tabelle 4**, ab Seite 20). Bei Proben von Tieren mit dem Vorbericht „Durchfall“ lagen die Nachweisraten mit 1,4 – 6,0 % nur geringgradig höher (Rothkamp et al., 2005; Waldmann et al., 2000). Im europäischen Ausland reichten die Prozentzahlen von 1,1 % in Belgien (Hommez et al., 1998) bis 27,0 % in Schweden (Hommez et al., 1998; Jacobson et al., 2005). Während in Deutschland eine Untersuchung bei 399 Betrieben lediglich eine Herdenprävalenz von 2,5 % ergab (Wendt et al., 2006) sind die Angaben für Skandinavien mit 9,0 – 14,0 % deutlich höher (Heinonen et al., 2000; Jacobson et al., 2005; Stege et al., 2000). Interessanterweise ist die Prävalenz von *B. intermedia* für finnische Betriebe mit durchfallkranken Tieren (9,0 %) um 3,0 % geringer als in Betrieben ohne durchfallkranke Schweine (12,0 %) (Heinonen et al., 2000).

B. intermedia wurde außer beim Schwein auch bei Mäusen und Ratten isoliert (Backhans et al., 2010). Beim Geflügel kann der Erreger ebenso wie *B. alvinipulli*, *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* die aviäre Spirochätose hervorrufen. Im Zusammenhang damit stehen Durchfall und eine reduzierte Eiproduktion (McLaren et al., 1997).

2.3.3 *Brachyspira innocens*

B. innocens ist bei Vergleich mit allen anderen *B. spp.* am nächsten mit *B. murdochii* verwandt. Beide Spezies weisen nach den Ergebnissen von Kreuzhybridisierungsstudien eine 64-66 %-ige Übereinstimmung der Gesamt-DNS auf (Stanton et al., 1997). Anhand von MLEE-Analysen ist es möglich, die beiden Brachyspirenspezies zu differenzieren (McLaren et al., 1997; Stanton et al., 1996). Eine sichere Abgrenzung ist aufgrund von Sequenzunterschieden in konservierten Genen wie dem *nox*-Gen (Atyeo et al., 1999) und dem 16S rRNS-kodierendem Gen (Stanton et al., 1997) auch unter Anwendung molekularbiologischer Techniken (PCR, Nukleotidsequenzierung, PCR/RFLP) möglich.

B. innocens gilt als apathogen für das Schwein (Hampson und La, 2006). Allerdings sind Pathogenitätsstudien mit *B. innocens* an Schweinen nur in einem begrenzten Umfang und mit einer geringen Anzahl von Tieren durchgeführt worden, so dass nur sehr spärliche Informationen vorliegen. Nach oraler Infektion von gnotobiotischen Ferkeln mit verschiedenen *B. innocens*-Stämmen kam es bei einigen Tieren (18,2%) zur Ausscheidung von schleimigem Kot. Diese Tiere wiesen bei der Sektion auch eine Colitis auf. Jedoch war dieses Ergebnis bei

Infektion von konventionellen Ferkeln nicht reproduzierbar (Neef et al., 1994). Ein an anderer Stelle von anderen Untersuchern durchgeführter Versuch an Schweinen führte zu keinerlei klinischen Symptomen (Burrough et al., 2012b). Nguyen Thi (2007) konnte dagegen bei einem Infektionsversuch mit einem erhöhten Anteil an Sojaschrot im Futter in Einzelfällen kurzzeitig eine dickbreiige Kotkonsistenz hervorrufen. Bei einer geringen Anzahl von Tieren (3/15 [20,0 %]) kam es nach Infektion mit *B. innocens*-Stämmen, die von Tieren mit Durchfall stammten, zu geringgradigen mikroskopischen Veränderungen in Form von oberflächlichen Ulzerationen und/oder Fibrinauflagerungen (Nguyen Thi, 2007).

Bei natürlich mit *B. innocens* infizierten Tieren zeigten histologische Untersuchungen von Gewebeschnitten, dass die Erreger auch in die Krypten, in Becherzellen und via Interzellularspalten bis in die *Lamina propria mucosae* invadieren können (Jensen und Boye, 2005).

Um Hinweise auf die klinische Relevanz von *B. innocens* zu gewinnen wurden Proben von an Durchfall erkrankten Schweinen von Rothkamp et al. (2005) auch auf andere darmpathogene Bakterien (hämolysierende *E. coli* und Salmonellen) untersucht. Diese wurden in mehr als der Hälfte der *B. innocens*-positiven Proben gefunden. Insgesamt waren *Salmonella* ssp. und/oder hämolysierende *E. coli* sogar am häufigsten in *B. innocens*-positiven Kotproben nachweisbar (58,0 %) seltener dagegen in *B. murdochii*- (34,0 %) oder *B. intermedia*-positiven Kotproben (11,0 %).

Zum Vorkommen von *B. innocens* in Schweinebeständen liegen diverse Studien vor (**Tabelle 4**, ab Seite 20). Die Nachweisraten in deutschen Betrieben reichen von 2,8 % bis 33,0 % (Rothkamp et al., 2005; Verspohl et al., 2001; Wendt et al., 2006). Sehr unterschiedliche Angaben liegen auch aus dem Ausland vor, wie z. B. 6,0 % für Österreich (Komarek et al., 2009) oder sogar bis zu 38,8 % für Spanien (Osorio et al., 2013). In Österreich wurden in wenigen Proben (7 von 202 untersuchten Tieren, 3,5 %) chronisch kranker Schweine (Durchfall, Kümern, respiratorische oder dermatologische Probleme) als einzige Erreger schwach-hämolysierende Brachyspiren, unter anderem auch *B. innocens* (einmal allein, dreimal mit anderen schwach-hämolysierenden *B. spp.*), nachgewiesen. Häufiger war der *B. innocens*-Befund jedoch mit dem Nachweis weiterer Erreger (andere schwach-hämolysierende *B. spp.*, hämolysierende *E. coli*, *L. intracellularis*, PCV-2) verbunden (8 von 12 Tiere, 66,7 %) (Komarek et al., 2009).

Die Herdenprävalenz für *B. innocens* wird in den publizierten Untersuchungen (**Tabelle 4**, ab Seite 20) stets zusammen mit *B. murdochii* angegeben und kann daher nicht speziesspezifisch beurteilt werden. Die *B. innocens*/*B. murdochii*-Prävalenz variiert je nach Land von 2,6 % für südkoreanische bis hin zu 78,0 % für finnische Betriebe mit an Durchfall erkrankten

Tieren (Heinonen et al., 2000; Lim et al., 2012). Betrachtet man aber im direkten Vergleich die Prävalenzen der Erreger in Betrieben ohne Durchfallgeschehen in diesen beiden Ländern (Finnland 50,0 %, Südkorea 41,4 %) welche deutlich niedriger (Finnland) (Heinonen et al., 2000) oder aber auch höher (Südkorea) (Lim et al., 2012) sein können, als in Betrieben mit durchfallkranken Tieren, so kann bei sehr vorsichtiger Betrachtungsweise auf eine geringe bis fehlende klinische Bedeutung beider Erreger geschlossen werden.

B. innocens-Infektionen treten darüber hinaus sowohl bei Nagern als auch beim Geflügel auf (Backhans et al., 2011; Backhans et al., 2010; Thomson et al., 2007) auf. Auch bei Pferden wurde *B. innocens* aus dem Kot isoliert. In einem Fall war dies auch mit Durchfall assoziiert, ohne dass andere bakterielle oder parasitäre Pathogene nachgewiesen werden konnten (Hampson et al., 2006a).

2.3.4 *Brachyspira murdochii*

B. murdochii wurde von Stanton et al. (1997) im Jahr 1997 an der Universität von Murdoch als *Serpulina murdochii* erstmals beschrieben. Im Jahr 2006 wurde die Spezies zusammen mit *Serpulina intermedia* reklassifiziert und in das Genus *Brachyspira* überführt (Hampson und La, 2006). Lange Zeit wurde *B. murdochii* für apathogen gehalten (Hampson und La, 2006; Stanton et al., 1997). In den letzten Jahren wird dies aber zunehmend kontrovers beurteilt. Zwar wurde der Erreger aus Schweinen isoliert, die keinen Durchfall zeigten (Fellstrom et al., 1996), aber andere Untersuchungen deuten auf ein pathogenes Potential des Erregers hin (Jensen und Boye, 2006; Weissenböck et al., 2005). So belegen Infektionsversuche die Fähigkeit des Erregers, den Dickdarm von gesunden Schweinen unter experimentellen Bedingungen zu besiedeln (Burrough et al., 2012b; Jensen et al., 2010; Nguyen Thi, 2007). Für die Infektion wurden *B. murdochii*-Stämme von durchfallkranken Tieren, bei denen keine weiteren pathogenen Darmbakterien nachweisbar waren, verwendet und über einen Zeitraum von drei Tagen mit 10^6 bis 5×10^9 KbE/Dosis intragastral an Ferkel verabreicht. Bei einer begrenzten Anzahl von Tieren [2 von 8 (Jensen et al., 2010) bzw. 6 von 24 (Nguyen Thi, 2007)] waren pathohistologisch Veränderungen in Form einer katarrhalischen Kolitis mit Infiltration der *Lamina propria mucosae* durch Entzündungszellen nachweisbar. Die Kolitiden waren gekennzeichnet durch Enterozytenhyperplasie, Fibrinauflagerungen, Kryptendilatation, sowie Schleimhautverdickungen und -ulzerationen (Jensen et al., 2010; Nguyen Thi, 2007). Die Erreger wurden vor allem im Kryptenlumen und im Oberflächenepithel, vereinzelt auch in der *Lamina propria mucosae* gefunden. Bei Tieren mit derartigen Veränderungen war das Ausmaß der Besiedlung des Kolons mit Brachyspiren größer als bei jenen Schweinen die pathohistologisch keine Läsionen im Kolon aufwiesen. Verglichen mit den pathohistologischen Bildern bei Infektionen mit *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* sind die Folgen einer Infektion mit *B. murdochii*, vor allem was die Oberflächen- und Kryptenläsionen betrifft, nicht so

gravierend. Die Schleimhautverdickung und Becherzellhyperplasie erscheinen allerdings in ihrer Ausprägung vergleichbar zu sein mit denen bei der PIS (Jensen et al., 2010). Klinische Symptome waren dagegen selten. Wenn überhaupt, trat vereinzelt über den Zeitraum von einigen Tagen eine weiche bis wässrige Kotkonsistenz, ähnlich wie bei an PIS erkrankten Tieren, auf. Verglichen mit den Symptomen einer *B. hyodysenteriae*-Infektion verlief die *B. murdochii*-Infektion jedoch ausgesprochen mild (Burrough et al., 2012b; Jensen et al., 2010). Für experimentelle Infektionsstudien an Schweinen wurde bisher nur eine geringe Anzahl Stämme verwendet (Wendt et al., 2009). Im Mausmodell erwies sich nur eines von fünf getesteten *B. murdochii*-Isolaten, die alle von kranken Schweinen stammten, als virulent und induzierte eine mittelgradig purulente Typhlitis. Dies deutet auf deutliche Virulenzunterschiede der einzelnen Stämme hin (Burrough et al., 2012a). Neben experimentellen Versuchen belegen auch Untersuchungen bei natürlich infizierten Schweinen, dass *B. murdochii* bei an Durchfall erkrankten Tieren allein als Auslöser einer Enterokolitis in Frage kommen kann (Palzer and Ritzmann, 2008; Weissenböck et al., 2005).

Über die Vorkommenshäufigkeit von *B. murdochii* in Deutschland gibt es sehr unterschiedliche Zahlen (**Tabelle 4**). Nach den Untersuchungen von Rothkamp et al. (2005) liegt der Prozentsatz positiver Proben mit 17,0 % bei Tieren mit Durchfall höher als bei Tieren ohne diesen Vorbericht (12,3 %). Nur wenige Jahre früher publizierten Verspohl et al. (2001) für Proben von Tieren mit unbekanntem Gesundheitsstatuts noch deutlich geringere Prozentwerte (1,3 bis 6,4 %). Untersuchungen, bei denen speziell an Durchfall erkrankte Tiere untersucht wurden, ergaben aber wiederum auch nur Prävalenzen von 3,8 bis 6,8 % (Waldmann et al., 2000; Wendt et al., 2006). Was die Herdenprävalenz anbetrifft liegt für Deutschland nur eine Angabe für die Jahre 2002/2003 von 9,5 % vor (Wendt et al., 2006). Betrachtet man die Zahlen, die im europäischen Raum für *B. murdochii*-positive Proben veröffentlicht wurden, so liegen auch hier nur wenige Prävalenzangaben vor. Diese belaufen sich bei Tieren mit Durchfall auf 2,2 % in Belgien (Hommez et al., 1998) bzw. 4,3 % in Dänemark (Jensen und Boye, 2005). In Österreich wurde bei chronisch erkrankten Tieren *B. murdochii* bei 9,9 % der Tiere identifiziert, wobei aber in nur einem Fall eine Monoinfektion mit *B. murdochii* bei Tieren mit postmortaler Diagnose einer Kolitis vorlag (Komarek et al., 2009). Bei einer Untersuchung von dänischen Schweinen mit Verdacht auf spirochätenbedingten Durchfall bzw. spirochätenbedingte Kolitis wurden in 4,3 % der Proben *B. murdochii* nachgewiesen, insgesamt aber ebenfalls nur sehr selten (1,4 %) ohne den gleichzeitigen Nachweis von anderen darmpathogenen Erregern (andere *B. spp.*, *L. intracellularis* oder PCV-2) (Jensen und Boye, 2005). Daten zur Herdenprävalenz liegen aus dem Ausland nur in Kombination mit *B. innocens* vor und sind daher bezogen auf *B. murdochii* allein nicht interpretierbar (siehe Abschnitt 2.3.3).

Neben dem Schwein treten *B. murdochii*-Infektionen auch beim Geflügel auf. *B. murdochii* scheint zwar bei diesem durchaus verbreitet zu sein (Bano et al., 2008; Stephens et al., 2005), Erkrankungen sind für diese Brachyspirenspezies jedoch nicht beschrieben (Nietfeld, 2013). Als Träger von *B. murdochii* kommen ebenso Ratten und Mäuse (Backhans et al., 2011; Backhans et al., 2010; Trott et al., 1996a) in Betracht. Auch Hunde können sich mit *B. murdochii* infizieren. In einer schwedischen Studie konnte in Isolatn durchfallkranker Hunde bei 42,9 % der Tiere *B. murdochii* nachgewiesen werden (Fellstrom et al., 2001a).

Tabelle 4 **Berichte zum weltweiten Vorkommen schwach hämolysierender *Brachyspira* spp. und differentialdiagnostisch bedeutsamer Pathogene bei Schweinen.**

Land Jahr	Alter bzw. Gewicht der Schweine	Be-triebe [n]	Untersuchte Tiere (T) bzw. Proben (P)	Dia-rrhoe	US-Mate-rial	US-Me-thode*	Nachweis schwach häm. <i>Brachyspira</i> Spezies (% Tiere / % Betriebe)	Nachweis anderer bedeutsamer Pathogene (Spezies / % Tiere / % Betriebe)	Refe-renz
A	k.A. 4-113 kg, ø10-30 kg	70	202 (T)	ja (97 T) und nein (105 T)	IP	KU, BT, PCR	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murdochii</i>	nur <i>B. spp.</i> Proben (n = 27) <i>C. perfringens</i> <i>E. coli</i> häm. <i>L. intracellularis</i> <i>S. choleraesuis</i> PCV2	KO 7,4 / k.A. 14,8 / k.A. 14,8 / k.A. 3,7 / k.A. 63,0 / k.A.
BE	k.A.	150	545 (P)	k.A.	349 IP 196 KP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murdochii</i>	<i>B. hyodysenteriae</i>	14,1 / k.A. HO
BR	1998 Aufzucht	17	206 (P)	ja	rKP	KU, BT, PCR	<i>B. pilosicoli</i> andere <i>B. spp.</i> n.t.	<i>B. hyodysenteriae</i>	3,9 / 35,3 BA
D	2007-2009 verschieden	95	1176 (T)	ja	rKP	PCR	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i>	8,4 / 24,2 12,6 / 48,4 RE
D	k.A.	121	749 (P)	k.A.	KP	PCR	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i>	4,0 / k.A. 9,7 / k.A. WR
D	k.A.	121	749 (P)	k.A.	KP	MR-PCR	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i>	3,6 / k.A. 7,9 / k.A. WR
D	2010 Absetzer	6	55 (T)	nein	rKP	k.A.	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>E. coli</i> häm. <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> sp.	0 78,2 / k.A. 0 0 WE
D	2010 Absetzer	6	63 (T)	ja	rKP	k.A.	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>E. coli</i> häm. <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> sp.	0 84,1 / k.A. 3,2 / k.A. 0 WE

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle auf Seite **26**

Land	Jahr	Alter bzw. Gewicht der Schweine	Be- triebe [n]	Untersuchte Tiere (T) bzw. Proben (P) [n]	Dia- rrhoe	US- Mate- rial	US-Me- thode*	Nachweis schwach häm. Brachyspiren Spezies (% Tiere / % Betriebe)	Nachweis anderer bedeutsamer Pathogene (Spezies / % Tiere / % Betriebe)	Refe- renz	
Fortsetzung der Tabelle 4											
D	2009- 2011	k.A.	k.A.	2050 (P) [nur <i>B. spp.</i> - positive Proben]	k.A.	KP	KU, BT, PCR- RFLP	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchii</i> n.t.	5,0 / k.A. 18,0 / k.A. 24,0 / k.A. 21,0 / k.A. 7,0 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 25,0 / k.A.	RD
D	k.A.	30-35 kg, ca. 12 Wo	1	14 (T)	ja	rKP, IP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchii</i>	0 7,1 / k.A. 28,6 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i> Corona-Viren 0 0 0	PR
D	2002- 2003	verschieden, v.a. Jung- sauen	399	812 (P)	ja	KP, IP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchii</i>	2,1 / 2,5 1,7 / 2,5 17,5 / 19,3 6,8 / 9,5	<i>B. hyodysenteriae</i> 15,9 / 21,1	WD
D	2002- 2004	verschieden	k.A.	2782 (P)	k.A.	KP	KU, BT oder RFLP	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchii</i> n.t.	2,0 / k.A. 4,9 / k.A. 22,4 / k.A. 12,3 / k.A. 0,3 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 20,7 / k.A.	RO
D	2004	verschieden	k.A.	115 (P) [nur <i>B. spp.</i> - positive Proben]	ja	KP	KU, BT oder RFLP	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchii</i>	0 / k.A. 7,8 / k.A. 41,7 / k.A. 20,0 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>E. coli</i> häm. <i>Salmonella</i> sp. 30,4 / k.A. 32,2 / k.A. 13,9 / k.A.	RO
D	1997- 1999	k.A.	k.A.	2975 (P)	k.A.	rKP, KP, IP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchii</i> n.t.	0,7 / k.A. 1,0 / k.A. 5,6 / k.A. 3,8 / k.A. 5,6 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 24,2 / k.A.	VE
D	1997	k.A.	k.A.	655 (P)	k.A.	IP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchii</i> n.t.	0 / k.A. 0,3 / k.A. 2,9 / k.A. 1,7 / k.A. 9,0 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 21,2 / k.A.	VE

Fortsetzung der Tabelle 4 auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle auf Seite 26

Land	Jahr	Alter bzw. Gewicht der Schweine	Be- triebe [n]	Untersuchte Tiere (T) bzw. Proben (P) [n]	Dia- rrhoe	US- Mate- rial	US-Me- thode*	Nachweis schwach häm. Brachyspiren Spezies (% Tiere / % Betriebe)	Nachweis anderer bedeutsamer Pathogene (Spezies / % Tiere / % Betriebe)	Refe- renz
Fortsetzung der Tabelle 4										
D	1998	k.A.	k.A.	893 (P)	k.A.	k.A.	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchisonii</i> n.k.	<i>B. hyodysenteriae</i> 	23,1 / k.A. VE
D	k.A.	k.A.	k.A.	212 (P)	ja	KP	KU, BT, IFT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchisonii</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> sp.	18,9 / k.A. WA 12,7 / k.A. 12,3 / k.A.
D	1999	k.A.	k.A.	1427 (P)	k.A.	k.A.	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchisonii</i> n.t.	<i>B. hyodysenteriae</i> 	26,3 / k.A. VE
DK	1998	30-50 kg	79	1580 (P) 20 (T) / B	nein	KP	KU	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens / murchisonii</i> k.A. / 34,2	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>E. coli</i> häm. <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> sp.	k.A. / 2,5 ST k.A. / 24,1 k.A. / 93,7 k.A. / 10,1
DK	k.A.	8-16 Mo	k.A.	140 (T)	ja	IP	Hyb	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchisonii</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i> PCV2	26,4 / k.A. JB 35,0 / k.A. 17,9 / k.A.
DK	1995- 1996	ø 41,5 kg	26	260 (T)	nein (B)	(r)KP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> andere <i>B. spp.</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>E. coli</i> häm. <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> sp.	0 MØ 4,0 / 27,0 29,0 / 75,0 0
DK	1995- 1996	ø 33,7 kg	72	720 (T)	ja (B)	(r)KP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> andere <i>B. spp.</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>E. coli</i> häm. <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> sp.	9,0 / 14,0 MØ 12,0 / 49,0 9,0 / 39,0 4,0 / 13,0

Fortsetzung der Tabelle 4 auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle auf Seite 26

Land	Jahr	Alter bzw. Gewicht der Schweine	Be- triebe [n]	Untersuchte Tiere (T) bzw. Proben (P) [n]	Dia- rrhoe	US- Mate- rial	US-Me- thode*	Nachweis schwach häm. Brachyspiren Spezies (% Tiere / % Betriebe)	Nachweis anderer bedeutsamer Pathogene (Spezies / % Tiere / % Betriebe)	Refe- renz
Fortsetzung der Tabelle 4										
ES	2000- 2003	verschieden	421	3849 (P) 5-20 (T) / B	ja	rKP	KU, PCR	<i>B. pilosicoli</i>	1, 1 / 5,2 <i>B. hyodysenteriae</i>	12,3 / 32,1 CA
ES	2001	verschieden	k.A.	k.A. 5-20 (T) / B	ja	rKP	KU, PCR	<i>B. pilosicoli</i>	0,7 / 2,2 <i>B. hyodysenteriae</i>	18,4 / 33,3 CA
ES	2002	verschieden	k.A.	k.A. 5-20 (T) / B	ja	rKP	KU, PCR	<i>B. pilosicoli</i>	1,0 / 3,7 <i>B. hyodysenteriae</i>	12,6 / 25,4 CA
ES	2003	verschieden	k.A.	k.A. 5-20 (T) / B	ja	rKP	KU, PCR	<i>B. pilosicoli</i>	1,6 / 5,3 <i>B. hyodysenteriae</i>	9,8 / 21,4 CA
ES/ P	2001- 2009	k.A.	57	67 (P) [nur <i>B. spp.</i> - positive Proben]	ja	k.A.	KU, PCR, SQ	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> <i>B. murchisonii</i> n.t.	0 10,4 / k.A. 38,8 / k.A. 46,3 / k.A. 4,5 / k.A.	0 OS
FIN	1997	Absetzer, ca. 25 kg	50	1000 20 (T) / B	ja und nein	rKP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> / <i>murchisonii</i>	k.A. / 28,0 k.A. / 10,0 k.A. / 74,0 <i>B. hyodysenteriae</i>	0 HE
FIN	1997	Absetzer, ca. 25 kg	42	840 20 (T) / B	ja	rKP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> / <i>murchisonii</i>	k.A. / 31,0 k.A. / 9,0 k.A. / 78,0 <i>B. hyodysenteriae</i>	0 HE
FIN	1997	Absetzer, ca. 25 kg	8	20 (T) / B → 160 (P)	nein	rKP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> / <i>murchisonii</i>	k.A. / 12,0 k.A. / 12,0 k.A. / 50,0 <i>B. hyodysenteriae</i>	0 HE

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle auf Seite **26**

Land	Jahr	Alter bzw. Gewicht der Schweine	Be- triebe [n]	Untersuchte Tiere (T) bzw. Proben (P) [n]	Dia- rrhoe	US- Mate- rial	US-Me- thode*	Nachweis schwach häm. Brachyspiren Spezies (% Tiere / % Betriebe)	Nachweis anderer bedeutsamer Pathogene (Spezies / % Tiere / % Betriebe)	Refe- renz
Fortsetzung der Tabelle 4										
H	k.A.	Mast, 5-6 Mo	31	558 (T); 186 SP 6 SP (à 3 P) / B	ja und nein	rKP	PCR, RFLP	Anteil der Sammelproben statt Tiere: <i>B. pilosicoli</i> 28,5 / 61,3	Anteil der Sammelproben statt Tiere: <i>B. hyodysenteriae</i> 12,4 / 45,2 <i>C. perfringens</i> A 24,7 / 61,3 <i>C. perfringens</i> C 5,9 / 25,8 <i>L. intracellularis</i> 58,1 / 93,6 <i>S. enterica</i> sp. 21,5 / 54,8	BI
H	k.A.	Mast, 5-6 Mo	10	60 (SP)	nein	rKP	PCR, RFLP	<i>B. pilosicoli</i> 31,7 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 1,7 / k.A. <i>C. perfringens</i> A 21,7 / k.A. <i>C. perfringens</i> C 5,0 / k.A. <i>L. intracellularis</i> 61,7 / k.A. <i>S. enterica</i> sp. 26,7 / k.A.	BI
H	k.A.	Mast, 5-6 Mo	21	126 (SP)	ja	rKP	PCR, RFLP	<i>B. pilosicoli</i> 27,0 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 17,5 / k.A. <i>C. perfringens</i> A 26,2 / k.A. <i>C. perfringens</i> C 6,4 / k.A. <i>L. intracellularis</i> 56,4 / k.A. <i>S. enterica</i> sp. 19,1 / k.A.	BI
I	2001- 2004	30-150 kg	74	k.A.	ja	KP, IP	KU, BT, PCR	<i>B. pilosicoli</i> k.A. / 9,5 <i>B. innocens / murchioi</i> k.A. / 2,7	<i>B. hyodysenteriae</i> k.A. / 17,6 F4-Fimbrien ⁺ <i>E. coli</i> k.A. / 8,1 <i>L. intracellularis</i> k.A. / 44,6 <i>Salmonella</i> sp. k.A. / 31,1	ME
PI	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	ja	KP	(nested) PCR	<i>B. pilosicoli</i> 0,8 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 10,0 / k.A. <i>L. intracellularis</i> 25,0 / k.A.	PL
ROK	1999- 2001	8-20 Wo	398	450 (T)	ja	KP	nested PCR	<i>B. pilosicoli</i> 15,5 / 10,1	k.A.	CH
ROK	2003- 2005	verschieden	68	483 (T)	ja und nein	KP, IP	KU, BT, PCR	<i>B. innocens / murchioi</i> 10,4 / 19,1	<i>B. hyodysenteriae</i> 1,0 / 7,4	LI
ROK	2003- 2005	verschieden	39	116 (T)	ja	KP, IP	KU, BT, PCT	<i>B. innocens / murchioi</i> 0,9 / 2,6	<i>B. hyodysenteriae</i> 4,3 / 12,8	LI

Fortsetzung der Tabelle 4 auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle auf Seite 26

Land	Jahr	Alter bzw. Gewicht der Schweine	Be- triebe [n]	Untersuchte Tiere (T) bzw. Proben (P) [n]	Dia- rrhoe	US- Mate- rial	US-Me- thode*	Nachweis schwach häm. Brachyspiren Spezies (% Tiere / % Betriebe)	Nachweis anderer bedeutsamer Pathogene (Spezies / % Tiere / % Betriebe)	Referenz
Fortsetzung der Tabelle 4										
ROK	2003- 2005	verschieden	29	367 (T)	n	KP	KU, BT, PCR	<i>B. innocens / murdochii</i> 13,4 / 41,4	<i>B. hyodysenteriae</i>	0 LI
S	k.A.	Verschieden	5	881 (P)	ja und nein	rKP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> 1,4 / k.A. <i>B. intermedia</i> 1,5 / k.A. <i>B. innocens / murdochii</i> 20,9 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i>	4,4 / k.A. FEa
S	k.A.	Mast, ca. 25 kg	9	27 (T)	nein**	IP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> 26,0 / k.A.	<i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>C. perfringens</i> <i>E. coli</i> <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia</i> spp. <i>Coccidia</i> andere Parasiten Rotaviren	37,0 / k.A. JAb 37,0 / k.A. 0 22,0 / k.A. 41,0 / k.A. 0 22,0 / k.A. 0 19,0 / k.A. 0
S	k.A.	Mast, ca. 25 kg	4	12 (T)	nein	IP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> 0	<i>Campylobacter coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>C. perfringens</i> <i>E. coli</i> <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Yersinia</i> spp. <i>Coccidia</i> andere Parasiten Rotaviren	92,0 / k.A. JAb 0 17,0 / k.A. 8,0 / k.A. 0 0 0 8,0 / k.A. 0 0
S	1996- 1997	k.A.	k.A.	5552 (P)	ja	k.A.	k.A.	<i>B. pilosicoli</i> 9,0 / k.A. <i>B. intermedia</i> 1,5 / k.A. <i>B. innocens / murdochii</i> 31,3 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i>	15,1 / k.A. FEb

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite, Erläuterungen am Ende der Tabelle auf Seite **26**

Land	Jahr	Alter bzw. Gewicht der Schweine	Be- triebe [n]	Untersuchte Tiere (T) bzw. Proben (P) [n]	Dia- rrhoe	US- Mate- rial	US- Me- thode*	Nachweis schwach häm. Brachyspiiren Spezies (% Tiere / % Betriebe)	Nachweis anderer bedeutsamer Pathogene (Spezies / % Tiere / % Betriebe)	Refe- renz
Fortsetzung der Tabelle 4										
S	1996- 2003	k.A.	3434	19836 (P)	ja	KP	k.A.	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> / <i>innocens</i> / <i>murdochii</i> 33,8 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> 14,7 / k.A.	RÄ
S	2001- 2002	8-12 Wo	105	1052 (P)	ja und nein	rKP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> / <i>murdochii</i> 13,0 / 32,4 2,0 / 14,0 35,0 / 78,0	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i> 0 27,0 / 47,6	JAA
S	2001- 2002	8-12 Wo	105	244 (T)	ja	rKP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> <i>B. intermedia</i> <i>B. innocens</i> / <i>murdochii</i> 48,0 / k.A. 27,0 / k.A. 18,0 / k.A.	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>L. intracellularis</i> 0 40,0 / k.A.	JAA
UK	1992- 1996	15-50 kg	85	1-6 (T) / B	ja	IP	KU, BT	<i>B. pilosicoli</i> andere <i>B. spp.</i> k.A. / 51,8 k.A. / 10,6	<i>B. hyodysenteriae</i> <i>C. perfringens</i> A F4-Fimbrien* <i>E. coli</i> <i>L. intracellularis</i> <i>Salmonella</i> sp. <i>Yersinia</i> sp. <i>Trichuris suis</i> k.A. / 10,6 k.A. / 2,4 k.A. / 5,9 k.A. / 15,3 k.A. / 14,1 k.A. / 20,0 0	TH

Erläuterungen: A = Österreich; BE = Belgien; B = Betriebe; BR = Brasilien; BT = biochemische Typisierung; ca. = circa; D = Deutschland; DK = Dänemark; ES = Spanien; FIN = Finnland; häm. = hämolysierend; H = Ungarn; Hyb = Hybridisierung; I = Italien; IFT = Immunfluoreszenzverfahren; IP = Intestinalprobe; k.A. = keine Angabe; MR-PCR = Multiplex-Realtime PCR; KP = Kotprobe; KU = kulturelle Untersuchung; n.t. = nicht typisierbare Isolate; P = Portugal; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; PCV2 = porcines Circovirus Typ 2; PI = Polen; RFLP = Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus; rKP = rektale Kotprobe; ROK = Südkorea; S = Schweden; sp. = Spezies; SP = Sammelprobe; spp. = Spezies (Plural); SQ = Sequenzierung; UK = Vereinigtes Königreich; v.a. = vor allem; ø = durchschnittlich; + = positiv; * = zum Nachweis schwach-hämolysierender Brachyspiiren; ** = aber Betriebe mit verminderter Leistung.

Referenzen: BA = Barcellos et al. (2000b); BI = Biksi et al. (2007); CA = Carvajal et al. (2006); CH = Choi et al. (2002); FEa = Fellstrom et al. (2001b); FEB = Fellström et al. (1998); HE = Heinonen et al. (2000); HO = Hommez et al. (1998); JAA = Jacobson et al. (2005); JAB = Jacobson et al. (2003); JB = Jensen und Boye (2005); KO = Komarek et al. (2009); LI = Lim et al. (2012); ME = Meriäldi et al. (2003); MØ = Møller et al. (1998); OS = Osorio et al. (2013); PL = Plawinska et al. (2004); PR = Palzer und Ritzmann (2008); RÄ = Rasbäck et al. (2004); RD = Rohde and Habighorst-Blome (2012); RE = Reiner et al. (2011a); RO = Rothkamp et al. (2005); ST = Stege et al. (2000); TH = Thomson et al. (1998); VE = Verspohl et al. (2001); WA = Waldmann et al. (2000); WE = Werner et al. (2011); WD = Wendt et al. (2006); WR = Willems und Reiner (2010).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Puffer sind im Anhang (ab Seite 84) aufgeführt.

3.1.2 Bakterienstämme

Als Kontrollen für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden zum Nachweis und zur Identifizierung verschiedener *Brachyspira* spp. dienen die in **Tabelle 5** aufgeführten Referenzstämme. Die fünf *Brachyspira* sp.-Isolate wurden von Frau Dr. J. Rohde (Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

Zur Kontrolle des Virulenzgenachweises im Rahmen der Bosworth-PCR (Abschnitt 3.3.2) wurden vier *Escherichia coli*-Referenzstämme eingesetzt. Die relevanten Eigenschaften dieser *E. coli*-Stämme sind in der **Tabelle 6** aufgeführt.

Tabelle 5 **Verwendete *Brachyspira* sp.-Kontrollstämme.**

Spezies	Stamm	Hämolyse auf TSA ^{CVSSR} -Agar	Herkunft
<i>B. hyodysenteriae</i>	B204	stark	Rohde
<i>B. pilosicoli</i>	2981	schwach	Rohde
<i>B. innocens</i>	2933	schwach	Rohde
<i>B. intermedia</i>	2334	schwach	Rohde
<i>B. murdochii</i>	2142	schwach	Rohde

Erläuterungen: Rohde = Dr. J. Rohde, Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Tabelle 6 **Verwendete *Escherichia coli*-Referenzstämme.**

Stamm	relevante Eigenschaften	Herkunft
Abbotstown	F4 (<i>faeG</i>)-, F6 (<i>fasA</i>)-Fimbrien, hitzestabile Enterotoxine ST-Ip (<i>estap</i>) und ST-II (<i>estb</i>), hitzelabiles Enterotoxin LT-I (<i>elt</i>)	Wray
B41	F5 (<i>fanA</i>), F41 (<i>fimF41A</i>)-Fimbrien, hitzestabiles Enterotoxin ST-Ip (<i>estap</i>)	Wray
E57	F18-Fimbrien (<i>fedA</i>), hitzestabiles Enterotoxin ST-II (<i>estb</i>), hitzelabiles Enterotoxin LT I (<i>elt</i>), Shigatoxin 2e (<i>stx2e</i>)	Wray
TTP-1	Intimin (<i>eae</i>), Shigatoxin 1 (<i>stx1</i>), Shigatoxin 2 (<i>stx2</i>)	Karch

Erläuterungen: Karch = Prof. Dr. H. Karch, Münster; Wray = Dr. C. Wray, Addelstone, UK.

3.1.3 Herkunft der Proben

Insgesamt wurden 165 Mastschweinebetriebe aus Nordhessen in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen. Diese wurden zunächst mit Hilfe der HIT-Datenbank, die der Schweinegesundheitsdienst (SGD) Hessen zur Verfügung stellte, ausgewählt. Die Zusammenarbeit mit dem SGD erfolgt hierbei sowohl mit Mitarbeitern des Landesbetriebs Hessisches Landeslabor, Standort Gießen, als auch mit Mitarbeitern der Klinik für Schweine (Innere Medizin und Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Von den in Nordhessen in der HIT-Datenbank gemeldeten Schweinebetrieben wurden alle Mastbetriebe mit mehr als 50 Tieren erfasst. Das ergab für diese Region eine Gesamtzahl von 379 Betrieben. Zur Bestimmung der Anzahl der notwendigerweise zu untersuchenden Bestände wurde eine Prävalenz für das Auftreten von mindestens einer Brachyspirenart von 5 % mit einer akzeptablen Abweichung von $\pm 2,5$ % veranschlagt. Bei Zugrundelegung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ergab sich somit eine Stichprobenanzahl von 165 Betrieben. Die zu untersuchenden Betriebe wurden per Zufallsauslese mit Hilfe des Programms Microsoft® Excel (Version 2010, Fa. Microsoft Deutschland, Bad Homburg) im Verhältnis zur Zahl der schweinehaltenden Betriebe auf die Landkreise Kassel, Waldeck-Frankenberg, Werra-Meißner-Kreis, Schwalm-Eder-Kreis, Hersfeld-Rotenburg und Fulda verteilt. Die **Abbildung 2** gibt die absoluten Zahlen der in die Untersuchung einbezogenen Betriebe in den einzelnen Landkreisen wieder.

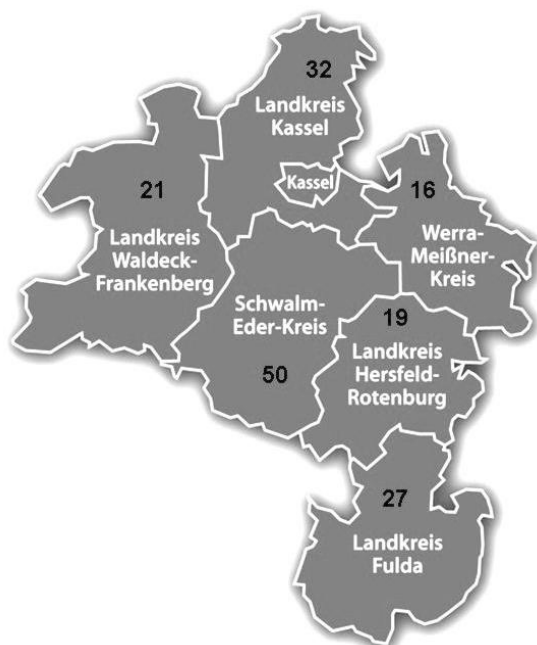


Abbildung 2:
Anzahl der in die Untersuchung einbezogenen Schweinemastbetriebe in den Landkreisen Nordhessens.
(Grafik: <http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Nordhessen.png>, Zugriff 27.2.2013)

3.1.4 Gewinnung der Proben

Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Betriebsinhaber per Anschreiben über das geplante Vorhaben informiert und im Anschluss telefonisch nach ihrer Bereitschaft zur Teilnahme an dem Untersuchungsvorhaben befragt. Die darauffolgenden Probenentnahmen erfolgten im Zeitraum von Juli 2011 bis Juni 2012. Je nach Größe des Betriebes wurden pro Herde zwischen ein und vier Sammelkottupferproben von Schweinen, möglichst im Stadium der Anfangsmast, entnommen. Eine Sammelprobe bestand aus vier Kottupferproben zufällig ausgewählter Tiere einer Bucht. Es wurden nur Tiere in die Studie aufgenommen, die antibiotisch nicht vorbehandelt waren, bzw. bei denen die letzte Behandlung mindestens 21 Tage zurücklag, so dass ein die Untersuchung beeinträchtigender Wirkspiegel nicht mehr zu erwarten war. Als Tupfer dienten Abstrichbestecke (Kunststoffstab mit Viscose Tupfer in Amies-Transportmedium; Fa. Nerbe Plus, Winsen/Luhe), die nach Entnahme umgehend in das Labor verbracht wurden.

Eine Überprüfung des Gesundheitsstatus der Mastschweine in den zu untersuchenden Betrieben erfolgte durch Adspektion und Befragung der Landwirte im Hinblick auf das Vorliegen einer Diarrhoe. Darüber hinaus wurden betriebsbezogene Daten von den Tierhaltern erfragt: (1) von wie vielen Züchtern werden die Ferkel bezogen, (2) wie erfolgt die Stallbelegung (kontinuierliches oder Rein-Raus-Verfahren), (3) wie viele Tiere werden in dem Betrieb in der Mastanlage gehalten (Betriebsgröße) und (4) handelt es sich um eine konventionelle oder eine biologische Schweinehaltung.

Das Vorgehen bei der labordiagnostischen Untersuchung der Proben auf das Vorkommen von Brachyspiren ist in der **Abbildung 3** dargestellt. Proben (n=70), die von Tieren mit Durchfall stammten, wurden zusätzlich molekularbiologisch auf das Vorkommen von *B. hyodysenteriae* und *Lawsonia intracellularis* untersucht. Bei 57 der 70 Proben von an Durchfall erkrankten Schweinen (81,4 %) erfolgte zudem eine kulturell-bakteriologische Untersuchung eingeschlossen einer Untersuchung auf Salmonellen als auch einer molekularbiologischen Differenzierung ausgewählter *E. coli* Stämme.

3.2 Kulturell-bakteriologische Methoden

Alle im Rahmen der vorliegenden Untersuchung entnommenen Kottupferproben wurden innerhalb von maximal 12 Stunden nach der Gewinnung wie unter Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben bearbeitet. Das für die DNS-Extraktion (siehe Abschnitt 3.3.1) verbliebene Probenmaterial wurde bis zum Beginn der Untersuchung bei -20 °C gelagert. Hierfür wurden die vier Tupferspitzen von Tieren einer Bucht gemeinsam in ein 2 ml Eppendorf-Cup gegeben.

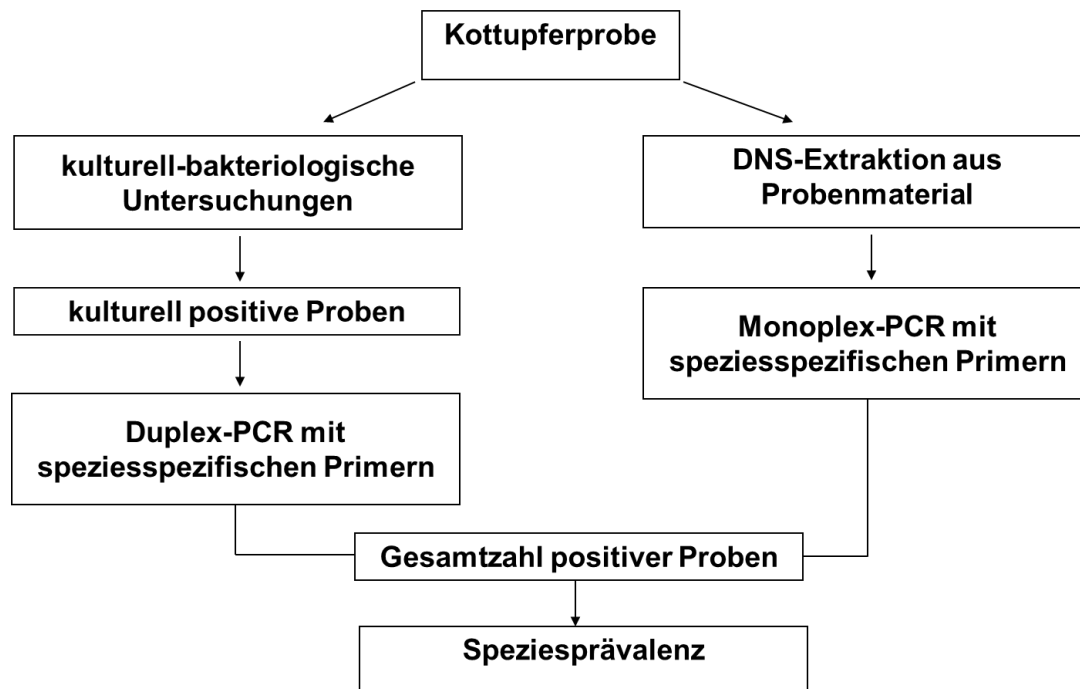


Abbildung 3: Ablauf der Diagnostik von *Brachyspira* in Kottupferproben von Schweinen.

3.2.1 Anzucht von Bakterien

3.2.1.1 *Brachyspira* spp.

Als feste Nährböden dienten TSA^{CVSSR}-Platten. Die vier Tupferproben einer Bucht wurden gemeinsam auf ca. 1/3 der Fläche des Nährbodens verteilt. Anschließend wurde ein Verdünnungsausstrich angefertigt und die Platten für maximal 10 d bei 38 °C unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertopf bzw. Gen Box, Biomerieux, Nürtingen; Anaerogen C, Oxoid, Wesel) bebrütet. Zur Erzeugung von Reinkulturen wurden unter mikroskopischer Kontrolle (Invertoskop, Leica, Darmstadt) verdächtige „Kolonien“ mit einer Impföse entnommen, auf TSA^{CVSSR}-Platten subkultiviert und anaerob bebrütet. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis nach makroskopischer und mikroskopischer Beurteilung die Kulturen frei von „Fremdkolonien“ erschienen. Eine abschließende Beurteilung auf Reinheit erfolgte mittels Dunkelfeld- bzw. Phasenkontrastmikroskopie (DM RB, Leica, Darmstadt). Anschließend wurden die Bakterien mit BHIF^{CVSSR}-Medium mit 25 % Glycerin abgeschwemmt und bis zur Durchführung der Duplex-PCRs (Abschnitt 3.3.2) bei -20 °C eingefroren. Solche Proben wurden als „Isolat“ bezeichnet.

Als Flüssigmedium diente BHIF^{CVSSR}-Medium. Die Vermehrung der Bakterien erfolgte in einem Volumen von 50 ml des Nährmediums, das in Duran[®]-Flaschen (100 ml) abgefüllt war. Als Inokulum dienten von festen Nährböden abgeschwemmte oder in BHIF^{CVSSR}-Medium

eingefrorene Bakteriensuspensionen mit einem Volumen von jeweils 1 ml. Zur Erzeugung einer anaeroben Atmosphäre wurde ebenfalls die „Gen Box“ und Anaerogen C (beides Oxoid, Wesel) eingesetzt. Nach Beimpfung wurden alle Kulturen auf dem Laborschüttler bei 38 °C für ca. 3-4 d inkubiert.

3.2.1.2 *Salmonella* spp.

Zur Überprüfung auf das Vorkommen von Salmonellen wurden die Kotproben in Salmonellen-Anreicherungsmedien (Tetrathionat- und Rappaport-Vassiliadis-Bouillon, Fa. Merck, Darmstadt) überimpft. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C und 43 °C. Nach 24- und 48-stündiger Inkubation wurden die Bouillons auf Gassneragar (Fa. Merck, Darmstadt) und ChromID Salmonella Agar (Biomérieux, Nürtingen) ausgestrichen. Diese Platten wurden nach 24 h Bebrütung bei 37 °C bzw. 43 °C auf das Wachstum von Laktose-negativen, Salmonellen-verdächtigen Kolonien, geprüft.

Salmonellen-verdächtige Kolonien wurden mit einem omnivalenten Anti-Salmonella (A-67)-Serum (Sifin GmbH, Berlin) mittels Objektträgerschnellagglutination untersucht. Bei positivem Ergebnis erfolgte eine biochemische Charakterisierung der Kolonien gemäß den Vorgaben zur Diagnostik von Salmonellen (Bisping und Amtsberg, 1988).

3.2.1.3 *Escherichia coli*

Zum Nachweis von *Escherichia coli* wurden die Kotproben auf Gassner-Platten ausgestrichen. Von Laktose-positiven, *E. coli*-verdächtigen Bakterienkolonien wurden je Probe fünf phänotypisch möglichst unterschiedlich aussehende Kolonien auf Blutagar subkultiviert und auf α -Hämolyse geprüft. Die Identifizierung mutmaßlicher hämolytischer, coliformer Kolonien erfolgte nach biochemischen Kriterien (Bisping und Amtsberg, 1988). Hämolytische *E. coli*-Isolate wurden mittels molekularbiologischer Methoden (siehe Abschnitt 3.3.2) auf Virulenzfaktoren untersucht, die eine Eingruppierung des Isolats in die Pathovaren der enterotoxischen (ETEC [„*elt*“, „*estap*“ und/oder „*estb*“ und „*faeG*“, „*fanA*“, „*fasA*“, „*fedA*“ und/oder „*fimF41A*“]), enteropathogenen (EPEC [„*eae*“]) oder enterotoxämischen *E. coli* (EDEC [„*fedA*“ und „*stx2e*“]) ermöglichte.

3.2.2 Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl von Brachyspiren wurde von den zu untersuchenden Bakteriensuspensionen eine dekadische Verdünnungsreihe in BHI-Medium angelegt und anschließend von jeder Verdünnungsstufe im Vierfachansatz 10 μ l Tröpfchen auf TSA^{CVSSR}-Platten aufgebracht. Nach dem Beimpfen wurden die Platten für 5 d unter anaeroben Bedingungen bei 38 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand der bei Vermehrung und Wachstum der Brachyspiren auftretenden Hämolyse. Die Anzahl der je Verdünnungsstufe

entstandenen Hämolysezonen wurde protokolliert und hieraus der Titer in Wachstums-bildenden Einheiten 50 je ml (WBE_{50}/ml) geschätzt (Kärber, 1931; Spearman, 1908).

3.2.3 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl von Spirochaetensuspensionen erfolgte mit Hilfe der Zählkammer nach Thoma. Bei diesen Suspensionen handelte es sich ausschließlich um in $BHIF^{CVSSR}$ -Medium vermehrte Brachyspiren. Nach Befüllen der Zählkammer wurden mindestens 400 Bakterien gezählt. Die Vorverdünnung der Brachyspirensuspensionen wurde so gewählt, dass je Kleinquadrat zwischen 2 und 12 Zellen vorlagen.

Die Zellzahl pro Milliliter unverdünnter Brachyspirensuspension wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Gesamtzahl der gezählten Bakterien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 4 \times 10^8}{\text{Zahl der ausgezählten Kleinquadrate} \times \text{gemessene Kammertiefe in } \mu\text{m}}$$

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Präparation von DNS aus Kottupferproben

Für die DNS-Extraktion wurden die vier abgetrennten Tupferspitzen von Tieren einer Bucht zusammen in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt, mit 1 ml Lysispuffer versetzt und nach 30 sec Mischen inkubiert (1 h, RT). Nach Zentrifugation (16000 x g, 1 min) wurde der Überstand zusammen mit 50 µl DE-Suspension (20 % [w/v] Kieselgur [SiO_2 , Sigma-Aldrich Chemie GmbH] in 0,17 M HCl) in ein steriles Eppendorf-Cup pipettiert und erneut inkubiert (10 min, RT). Nach Mischen (30 sec) und Zentrifugieren (16000 x g, 1 min) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet wie folgt gewaschen: zweimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer (6 M GuSCN, 100 mM Tris-HCl, pH 6,4), zweimal mit jeweils 200 µl eiskaltem Äthanol (Merck KGaA, Darmstadt), einmal mit 200 µl eiskaltem Aceton (Merck KGaA, Darmstadt). Zwischen diesen Waschschritten wurde der Ansatz jeweils gemischt (30 sec) und zentrifugiert (16000 x g, 1 min). Nach dem Trocknen des Pellets (15 min, 56 °C) wurde die DNS mittels Zugabe von 75 µl Lagerungspuffer (5 mM Tris-HCl [pH 8,4], 0,5 mM EDTA, pH 8,4), Mischen (30 sec) und Zentrifugieren (16000 x g, 1 min) extrahiert. Die DNS wurde in sterile 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert und bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

3.3.2.1 Monoplex-PCR zum Nachweis von Brachyspiren

Die extrahierte DNS von jeder Sammelprobe wurde mit fünf Monoplex-PCRs getestet: vier PCRs mit speziesspezifischen Primerpaaren für schwach hämolysierende Brachyspiren und eine PCR zum Nachweis von *B. hyodysenteriae* (**Tabelle 8**).

Ein Reaktionsansatz (30 µl) einer Monoplex-PCR enthielt jeweils 1 U PANScripT DNA Polymerase (Fa. PAN Biotech, Aidenbach), Primer in einer Konzentration von je 0,5 µM (**Tabelle 8**), 133 µM je Nukleotid (Fa. PAN Biotech, Aidenbach) 1x PCR-Puffer (Fa. PAN Biotech, Aidenbach), 2 mM MgCl₂, (50 mM, Fa. PAN Biotech, Aidenbach) und 3 µl Matrizen-DNS (extrahierte DNS der Sammelproben). Die Reaktionsbedingungen für die einzelnen PCRs sind in **Tabelle 7** aufgeführt.

3.3.2.2 Monoplex-PCR zum Nachweis von *Lawsonia intracellularis*

Ein Reaktionsansatz (30 µl) enthielt jeweils 1 U Platinum® Taq Polymerase (Fa. Invitrogen / Life Technologies, Darmstadt), je 0,5 µM der entsprechenden Primer (**Tabelle 8**), 133 µM je Nukleotid (Fa. PAN Biotech, Aidenbach), 1x PCR-Puffer (Fa. Perkin Elmer, Rodgau), 2 mM MgCl₂, (50 mM, Fa. PAN Biotech, Aidenbach) und 1 µl Matrizen-DNS (extrahierte DNS der Sammelproben). Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind der **Tabelle 7** zu entnehmen.

3.3.2.3 Duplex-PCRs zur Charakterisierung kultivierter schwach hämolysierender *Brachyspira* spp. bis zur Speziesebene

Die durch die kulturelle Anzucht gewonnenen *Brachyspira*-Isolate wurden mit zwei Duplex-PCRs bis zur Speziesebene charakterisiert. Hierzu wurden die Primer für *B. pilosicoli* und *B. innocens* (Duplex-PCR A) und jene für *B. intermedia* und *B. murdochii* (Duplex-PCR B) kombiniert eingesetzt (**Tabelle 8**).

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze war mit jenen für die Monoplex-PCR identisch. Abweichend war lediglich die Menge der verwendeten Primer. So betrug die Endkonzentration der Primer in der Duplex-PCR A 0,5 µM für beide Primerpaare, in der Duplex-PCR B 3 µM bei den *B. murdochii*-Primern und 1,1 µM für die *B. intermedia*-Primer.

Die Amplifikation erfolgte in den Thermocyclern T-Gradient und T-1 (Fa. Biometra, Göttingen) gemäß den in der **Tabelle 7** angegebenen Parametern.

3.3.2.4 Bosworth-PCR zum Nachweis von Virulenzgenen bei hämolysierenden *E. coli*

Die Untersuchung auf Virulenzgene (*elt*, *estap*, *estb*, *stx2e*, *faeG*, *fanA*, *fasA*, *fedA*, *fimF41a*, *eae*) bei *E. coli* wurde mit einer Multiplex-PCR nach Barth et al. (2007) durchgeführt. Die ver-

wendeten Primer sind der **Tabelle 8**, die Reaktionsbedingungen der **Tabelle 7** zu entnehmen.

3.3.3 Primer

Alle verwendeten Primer (**Tabelle 8**) wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) hergestellt. Die Primer wurden als Stocklösungen (100 µM) bei -70 °C und als Gebrauchslösung (20 µM) bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7 Reaktionsbedingungen und Kontrollen der verwendeten PCRs.

PCR-Typ	PCR-Name	Reaktionsbedingungen		Kontrollstämme, Kontrollmatrix
		Zyklus	Temperatur - Dauer	
Monoplex-PCR	Pilo-PCR	1	94 °C - 5 min	<i>B. pilosicoli</i> Stamm 2981
		2-30	94 °C - 30 sec 59 °C - 30 sek 72 °C - 1 min	
		31	72 °C - 5 min	
	Inter-PCR	wie bei Pilo-PCR		<i>B. intermedia</i> Stamm 2334
	Inno-PCR	wie bei Pilo-PCR		<i>B. innocens</i> Stamm 2933
	Murd-PCR	wie bei Pilo-PCR		<i>B. murdochii</i> Stamm 2142
	Hyo-PCR	1	94 °C - 1 min	<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm B204
		2-30	94 °C - 30 sec 63 °C - 30 sec 72 °C - 30 sec	
		31	72 °C - 7 min	
	Lawsonien-PCR	1	94 °C - 5 min	Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim)
		2-30	94 °C - 30 sec 60 °C - 30 sek 72 °C - 1 min	
		31	72 °C - 5 min	
Duplex-PCR	Duplex-PCR A	1	94 °C - 5 min	<i>B. pilosicoli</i> Stamm 2981 und <i>B. innocens</i> Stamm 2933
		2-30	94 °C - 30 sec 55 °C - 30 sek 72 °C - 90 sec	
		31	72 °C - 5 min	
	Duplex-PCR B	wie bei Duplex-PCR A		<i>B. intermedia</i> Stamm 2334 und <i>B. murdochii</i> Stamm 2142
Multiplex-PCR	Bosworth-PCR	1	94 °C - 5 min	<i>E. coli</i> Stamm B41, <i>E. coli</i> Stamm Abbotstown, <i>E. coli</i> Stamm E57 und <i>E. coli</i> Stamm TTP-1
		2-31	94 °C - 30 sec 55 °C - 30 sec 72 °C - 30 sec	
		32	72 °C - 5 min	

Tabelle 8 Bezeichnung und Lokalisation der verwendeten Primer im Genom

PCR(s)	Primername	Sequenz (5' → 3')	Gen	Organismus	Position ¹⁾	Sequenz-Nr.:	Amplikon	Ref. ²⁾
Pilo-PCR, Duplex-PCR A	Pilo-f1	AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC	16S	<i>B. pilosicoli</i>	165-185	JF430726	821	1
	Pilo-r1	GCACCTATGTTAAACGTCCTTG	rRNS		<u>964-985</u>			
Inter-PCR, Duplex-PCR B	Int1-mod	AGAGTTTGAAGACAATTATGAC	nox	<i>B. intermedia</i>	267-288	AF060811	453	2, 3
	Interm2004-R2	GACATAACTACCATATCTACT			<u>699-719</u>			
Inno-PCR, Duplex-PCR A	InnoF1	ATGGTGCTATATAAAAGTAGAC	nox	<i>B. innocens</i>	778-797	AF060805	249	3
	InnoR1	ACCAACCAAGTAGAAGCCATG			<u>1007-1026</u>			
Murd-PCR, Duplex-PCR B	Murd-F1	GAATACTGCGGTACTCAAGGA	nox	<i>B. murdochii</i>	956-976	AF060813	260	3
	Murd-R1	GAGAAATGCGTGAATAGCTTCG			<u>1195-1215</u>			
Hyo-PCR	Bhyo1	GCTAGTCCTGAAAGTTTGAGAGG	nox	<i>B. hyodysenteriae</i>	407-429	U19610	435	4
	Bhyo2	AGCTTCATCAGTGATTCTTTATCA			<u>817-841</u>			
Lawsonien-PCR	Lawfor	TATGGCTGTCAAACACTCCG	aspA	<i>Lawsonia intracellularis</i>	1142736-1142755	AM180252	329	5
	Lawrev	TGAAGGTATTGGTATTCTCTCC			<u>1143045-1143064</u>			
Bosworth-PCR	LT-1	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	elt	<i>E. coli</i>	33-52	M15363	272	6
	LT-2	TGGTCTCGGTCAGATATGT			<u>305-287</u>			
Bosworth-PCR	STaP-1	CAACTGAATCACCTTGACTCTT	estap	<i>E. coli</i>	347-367	V00612	158	6
	STaP-2	TTAATAACATCCAGCACAGG			<u>504-485</u>			
Bosworth-PCR	STb-1	TGCCATGCATCTACACAAT	estb	<i>E. coli</i>	225-244	M35729	113	6
	STb-2	CTCCAGCAGTACCATCTCTA			<u>337-318</u>			
Bosworth-PCR	Stx2e-1	AATAGTATACGGACAGCGAT	stx2e	<i>E. coli</i>	359-378	M21534	733	6
	Stx2e-2	TCTGACATTCTGGTTGACTC			<u>1091-982</u>			

Fortsetzung und Erläuterung der **Tabelle 8** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 8**

PCR(s)	Primername	Sequenz (5' → 3')	Gen	Organismus	Position ¹⁾	Sequenz-Nr.:	Amplikon	Ref. ²⁾
Bosworth-PCR	K88-1	GAATCTGTCCGAGAAATATCA	faeG	<i>E. coli</i>	183-202 <u>681-662</u>	M29375	499	6
	K88-2	GTTGGTACAGGTCTTAATGG						
Bosworth-PCR	K99-1	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA	fanA	<i>E. coli</i>	488-507 <u>717-698</u>	X05797	230	6
	K99-2	AAC TTGTGGTTAACTTCCT						
Bosworth-PCR	P987-1	AAGTTACTGCCAGTCTATGC	fasA	<i>E. coli</i>	705-724 <u>1114-1095</u>	U50547	409	6
	P987-2	GTAAC TCCACCGTTTGATC						
Bosworth-PCR	F18-1	TGGTAACGTATCAGCAACTA	fedA	<i>E. coli</i>	246-265 <u>558-539</u>	M61713	313	6
	F18-2	ACTTACAGTGCTATTCGACG						
Bosworth-PCR	F41-1	AGTATCTGGTTCAGTGATGG	fimF41a	<i>E. coli</i>	299-318 <u>910-891</u>	X14354	612	6
	F41-2	CCACTATAAGAGGTTGAAGC						
Bosworth-PCR	F-EaeA-1	ATATCCGTTTAAATGGCTATCT	eae	<i>E. coli</i>	1060-1081 <u>1484-1463</u>	Z11451	425	7
	F-EaeA-2	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA						

Erläuterungen: **1)** Die Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der NCBI-Datenbank, die Positionen der Gegenstrang-
primer sind unterstrichen, **2) Referenzen:** **1:** La et al., 2003; **2:** Phillips et al., 2006; **3:** Weissenböck et al., 2005; **4:** Herbst et al.,
2004; **5:** Jones et al., 1993; **6:** Casey und Bosworth, 2009; **7:** Franck et al., 1998.

3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Detektion der PCR-Produkte fand mittels Gelelektrophorese statt. Für die Agarosegelelektrophorese kamen horizontale Flachbettgele mit 2,5 % Agarose (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg), 0,01 µg/ml Ethidiumbromid (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) und 1x TAE als Elektrophoresepuffer zum Einsatz. Für die Auftrennung der Proben wurde eine Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand für 40 bis 120 min angelegt. Zur Größenbestimmung der DNS-Fragmente wurde auf jedem Gel ein Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus, Fa. Fermentas, St. Leon Roth) mitgeführt.

3.3.5 Spezifität und Sensitivität der Monoplex-PCRs zum Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren

Zur Überprüfung der **Spezifität** der Monoplex-PCRs wurden die speziesspezifischen Primerpaare (**Tabelle 8**) mit den jeweiligen Referenzstämmen schwach hämolysierender Brachyspiren (**Tabelle 5**) getestet.

Die **Sensitivität** der vier Monoplex-PCRs wurde anhand dekadischer Verdünnungsreihen (10^{-1} bis 10^{-8}) von Brachyspirensuspensionen mit bekannter Zellzahl (Brachyspiren-Zählung in einer Zählkammer nach Thoma) ermittelt. Hierfür wurde eine Mischkotprobe von 5 Schweinen, die zuvor negativ auf *B. spp.* getestet wurden, aliquotiert und die Aliquots mit vorher hergestellten unterschiedlichen Mengen an Spirochäten versetzt und intensiv gemischt. Aus diesen Kotproben wurde die DNS extrahiert und die DNS-Extrakte als Matrizie in die Monoplex-PCR eingesetzt. Es wurden die Nachweisgrenzen definiert (Zellen/g Kot), bis zu der die PCR noch ein deutliches Signal lieferte.

3.3.6 Spezifität der Duplex-PCRs zur Speziesbestimmung schwach hämolysierender Brachyspiren

Zur Überprüfung der Spezifität der beiden Duplex-PCRs dienten ebenfalls die bereits unter 3.3.4 zur Speziesprüfung der Monoplex-PCRs verwendeten Referenzstämme.

Zudem wurde überprüft, ob in den Duplex-PCRs große Mengen der DNS einer Spezies die Amplifikation der DNS der jeweils anderen Spezies behindern. Hierfür wurden jeweils gleichlautende Verdünnungsstufen dekadischer Verdünnungsreihen der schwach hämolysierenden Brachyspiren in BHIF^{CVSSR}-Medium überkreuzend zusammen pipettiert und als Mischung in der PCR eingesetzt.

3.4 Datenhaltung und Auswertung

3.4.1 Bilddokumentation

Die Visualisierung und Fotodokumentation von Agarosegelen erfolgte mit dem Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH, Typ RH-3 (Fa. Herolab, Wiesloch) unter UV-Beleuchtung.

3.4.2 Statistische Datenauswertung

Die Datenhaltung und -auswertung, sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die statistischen Auswertungen erfolgte unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 8.1 (Dixon, 1993). Zur Beschreibung der Daten wurden von den quantitativen, annähernd normalverteilten Merkmalen arithmetische Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s), Minima (x_{\min}), Maxima (x_{\max}) und Stichprobenumfänge (n) berechnet und tabellarisch wiedergegeben.

Die qualitativen Merkmale wurden nach Gruppen getrennt ausgezählt und in Form von (zweidimensionalen) Häufigkeitstabellen (Kontingenztafeln) dargestellt. Für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale wurden Häufigkeitstabellen mit dem Programm BMDP4F erzeugt und mit dem (verallgemeinerten) Fisher-Test/Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Hier wurde das Programm „StatXact“ und das Programm „BiAS“ verwendet (Cytel, 2010; Ackermann, H., 2010).

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wurde - wenn möglich - der exakte p-Wert angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Mono- und Duplex-PCRs zur Identifizierung schwach hämolysierender Brachyspiren

4.1.1 Spezifität und Sensitivität der Monoplex-PCRs

Bei der Überprüfung der Diskriminierungsfähigkeit zwischen den *Brachyspira* Spezies *pilosicoli*, *innocens*, *intermedia* und *murdochii* erzeugten die verwendeten *Brachyspira* Spezies-spezifischen Primerpaare, die nach publizierten Daten synthetisiert wurden, ausschließlich mit den jeweiligen (homologen) Referenzstämmen ein Signal (**Tabelle 9**).

Tabelle 9 Spezifität der Monoplex-PCRs zum Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren in Kotproben vom Schwein

PCR-Name	Zielspezies	Ergebnis der Monoplex-PCRs unter Verwendung von DNS verschiedener <i>Brachyspira</i> spp. als Templates			
		<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. innocens</i>	<i>B. intermedia</i>	<i>B. murdochii</i>
Pilo-PCR	<i>B. pilosicoli</i>	+	-	-	-
Inno-PCR	<i>B. innocens</i>	-	+	-	-
Inter-PCR	<i>B. intermedia</i>	-	-	+	-
Murd-PCR	<i>B. murdochii</i>	-	-	-	+

Erläuterungen: + = positiv (Amplifikat mit erwarteter Länge), - = negativ (kein Amplifikat).

Was die Untersuchungen zur Sensitivität der Monoplex-PCRs zum Nachweis der vier verschiedenen *Brachyspira* spp. in Kotproben vom Schwein anbetrifft, ergaben sich nur geringfügige Unterschiede von maximal einer log₁₀-Verdünnungsstufe zwischen den beiden Versuchsdurchführungen, für den Nachweis von *B. murdochii* sogar zweimal identische Nachweisgrenzen von 10⁴ Zellen/g Kot. Die Werte für *B. pilosicoli* lagen zwischen 10³ und 10⁴ Zellen/g Kot und für *B. intermedia* und *B. innocens* jeweils zwischen 10⁴ und 10⁵ Zellen/g Kot (**Tabelle 10**).

4.1.2 Spezifität und Sensitivität der Duplex-PCRs

Bei der Überprüfung der Duplex-PCRs unter Verwendung der vier Referenzstämmen als Templates entsprachen alle generierten PCR-Signale den Erwartungen hinsichtlich Länge und detektierter Spezies. Letzteres bedeutet, dass die beiden eingesetzten Primerpaare, die spezifisch für *B. pilosicoli* und *B. innocens* bzw. für *B. intermedia* und *B. murdochii* waren, in den jeweiligen Duplex-PCRs nur Amplifikate bei den entsprechenden eingesetzten Referenz-

stämmen induzierten. Die **Abbildung 1** zeigt ein repräsentatives Elektropherogramm der Duplex-PCR A.

Tabelle 10 **Sensitivität der speziesspezifischen Monoplex-PCRs zum Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren in Kotproben vom Schwein**

Versuch ¹	Nachweisgrenze im Schweinekot [Zellen/g Kot]			
	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. intermedia</i>	<i>B. innocens</i>	<i>B. murdochii</i>
1	$4,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$
2	$4,6 \times 10^3$	$3,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$

Erläuterung: 1) Die Bestimmung erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen.

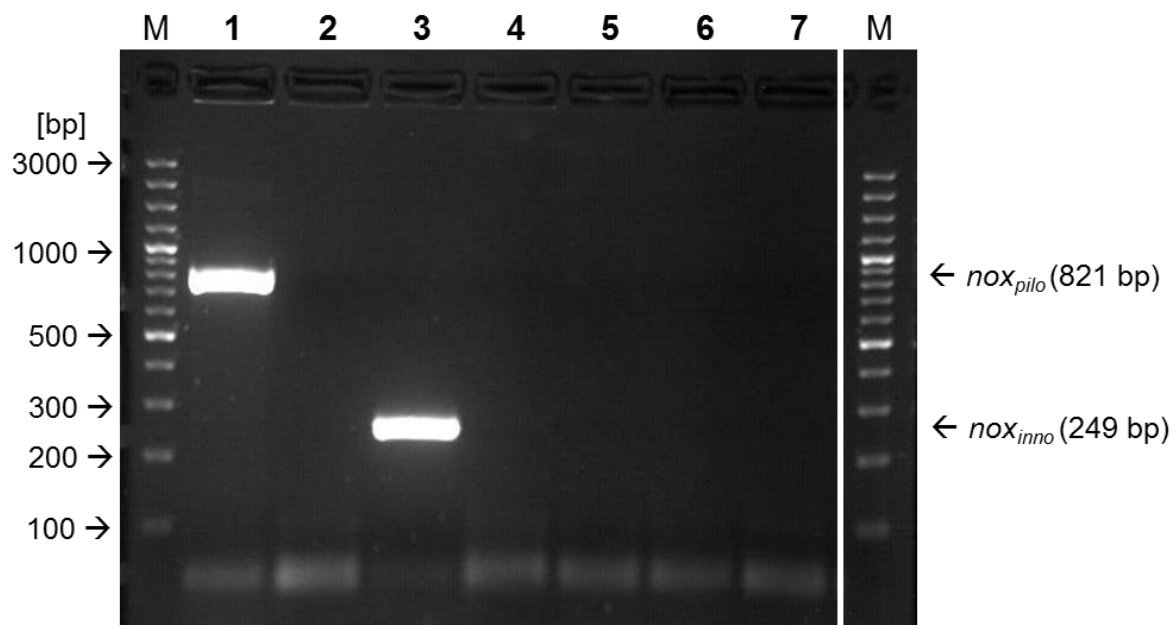


Abbildung 4: **Elektropherogramm der Duplex-PCR A zur Identifikation von *B. pilosicoli* und *B. innocens***

(2 %iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung).

1 = *B. pilosicoli*, **2** = *B. intermedia*, **3** = *B. innocens*, **4** = *B. murdochii*,

5 = *B. hyodysenteriae*, **6** = Negativkontrolle BHIF^{CVSSR}-Medium,

7 = Negativkontrolle A. dest, **M** = Molekularmassenstandard (Gene

RulerTM 100 bp DNS Ladder Plus), **bp** = Basenpaare.

Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob die Duplex-PCRs bei dem möglichen Vorhandensein zweier unterschiedlicher Spezies, in gleichzeitig auch sehr unterschiedlichen Konzentrationen, geeignet ist, beide Spezies sicher zu detektieren. Nach den in **Abbildung 5** dargestellten Ergebnissen werden die etablierten PCR-Techniken von dem unterschiedli-

chen Gehalt der zu dem PCR-Reaktionsmix hinzu pipettierten Brachyspiren wenig beeinflusst. Beide Spezies werden auch bei Vorliegen unterschiedlich hoher Konzentrationen (hohe Keimzahl einer Spezies bei niedriger Keimzahl der anderen Spezies) im Probenmisch sicher detektiert. Die **Tabelle 11** zeigt, dass für eine sichere Auswertung der Duplex-PCRs, Templates mit minimalen Keimkonzentrationen von mindestens 10^5 Zellen/ml erforderlich waren.

Tabelle 11 Erforderliche Mindestkonzentrationen an Spirochäten im Template bei der Differenzierung von Brachyspiren mittels Duplex-PCRs A und B

Versuch ¹	Erforderliche Mindestkonzentration an Brachyspiren im Template [Zellen/ml]			
	Duplex-PCR A		Duplex-PCR B	
	<i>B. pilosicoli</i>	<i>B. innocens</i>	<i>B. intermedia</i>	<i>B. murdochii</i>
1	$4,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$3,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
2	$4,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$

Erläuterung: 1) Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen.

4.2 Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren bei Schweinen aus nordhessischen Mastbeständen

Zur Unterscheidung der in dieser Arbeit angewendeten Verfahren wird nachfolgend die hier angegebene Nomenklatur verwendet: So bezeichnet „**kulturelle Anzucht**“ die Ergebnisse aus Probenmaterial, das auf TSA^{CVSSR}-Agar kulturell angelegt wurde und nachfolgend die hierbei isolierten schwach hämolysierenden Brachyspiren mit Hilfe zweier Duplex-PCRs auf ihre Spezies bestimmt wurden. Dagegen bezeichnet „**PCR-Verfahren**“ diejenigen Ergebnisse, bei denen aus Kottupferproben die Gesamt-DNS isoliert und direkt vier Monoplex-PCRs zugeführt wurde, um auf Brachyspiren Spezies-spezifische DNS-Abschnitte getestet zu werden.

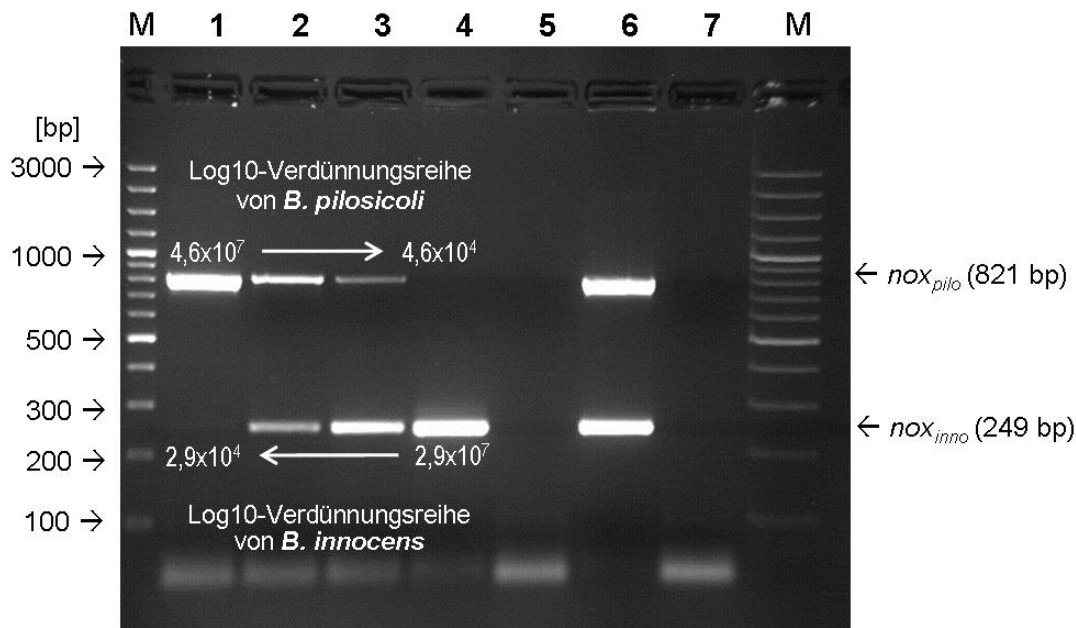


Abbildung 5: Elektropherogramm von Bakteriensuspensionen mit unterschiedlich hohen Konzentrationen von *B. pilosicoli* und *B. innocens* nach Duplex-PCR A (Elektropherogramm eines 2 %igen Agarosegels nach Ethidiumbromidfärbung).
 1 - 4 = die jeweiligen Verdünnungsstufen, 5 = Negativkontrolle A. dest.,
 6 = Positivkontrolle der Referenzstämme, 7 = Negativkontrolle BHIF^{CVSSR}-Medium, M = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus), bp = Basenpaare.

4.2.1 Individuelle Auswertung der Untersuchungen (Sammelkotproben)

4.2.1.1 Durch kulturelle Anzucht nachgewiesene Anzahl *Brachyspira* spp.-positiver Proben

Von den insgesamt 525 kulturell untersuchten Sammelkotproben wurden in 383 Proben (73,0%) schwach hämolyisierende *Brachyspira* spp. isoliert. Am seltensten war nach den Ergebnissen der Speziesidentifizierung mittels Duplex-PCRs *B. pilosicoli* (in nur 4,8 % der Sammelkotproben) nachweisbar. *B. intermedia* und *B. innocens* traten bei 27,8 % bzw. 33,1 % der Sammelkotproben auf. Am häufigsten wurde *B. murdochii* mit 38,5 % nachgewiesen (Tabelle 12).

Ein kleiner Anteil (n=20) der kulturell positiven Proben (schwache Hämolyse, im Dunkelfeldmikroskop Spirochäten nachweisbar) war jedoch mittels Duplex-PCRs nicht identifizierbar. Über weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Isolate wird an anderer Stelle berichtet werden.

4.2.1.2 Mittels PCR-Verfahren ermittelte Anzahl *Brachyspira* spp.-positiver Proben

Insgesamt 68,0 % der mittels Monoplex-PCRs untersuchten Sammelkotproben wiesen DNS-Fragmente schwach hämolysierender *Brachyspira* auf. Auch mit dieser Methodik ergab sich für *B. pilosicoli* die geringste Nachweisrate (5,0 %). Dagegen war *B. intermedia* mit 16,2 % deutlich seltener nachweisbar als beim kulturellen Anzuchtverfahren. Der ermittelte Wert für *B. innocens* (37,8 %) lag nur geringfügig über dem Wert des Vergleichsverfahren (33,1 %). *B. murdochii* trat in der Hälfte aller Proben auf (Tabelle 12).

4.2.1.3 Gesamtzahl der mittels kultureller Anzucht und PCR-Verfahren identifizierten *Brachyspira* spp.-positiven Proben

Die Gesamtzahl *Brachyspira* spp.-positiver Proben umfasst alle Proben, die entweder mit einer oder mit beiden Methoden detektiert wurden. *B. pilosicoli* hatte dabei die niedrigste (6,5 %), *B. murdochii* die höchste (65,3 %) Nachweisrate (Tabelle 12). In etwas mehr als der Hälfte (52,0 %) aller Proben konnte *B. innocens* detektiert werden.

Tabelle 12 Nachweisraten schwach-hämolysierender *Brachyspira* in Sammelkotproben mittels kultureller Untersuchung und PCR

Spezies	<i>Brachyspira</i> spp.-positive Sammelkotproben [n (%)]		
	kulturelle Anzucht	PCR-Verfahren	Gesamt
<i>B. pilosicoli</i>	25 (4,8)	26 (5,0)	34 (6,5)
<i>B. intermedia</i>	146 (27,8)	85 (16,2)	181 (34,5)
<i>B. innocens</i>	174 (33,1)	198 (37,8)	273 (52,0)
<i>B. murdochii</i>	202 (38,5)	262 (50,0)	343 (65,3)

Wie aus **Abbildung 6** hervorgeht, waren nur bei der Hälfte der *B. pilosicoli*-positiven Sammelkotproben die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden übereinstimmend. In den verbleibenden 50,0 % der *B. pilosicoli* positiven Proben basierte die Diagnose entweder auf der kulturellen Anzucht oder dem PCR-Verfahren aus Kot-DNS-Extrakten. Bei *B. innocens* waren es noch 36,3 % der Proben, die bei beiden Methoden zu einem positiven Ergebnis führten. Statistisch war keines der beiden Untersuchungsverfahren für *B. pilosicoli* und *B. innocens* dem anderen überlegen (McNemar-Test, $p > 0,069$). Bei *B. intermedia* und *B. murdochii* war der Anteil übereinstimmender Ergebnisse noch geringer. So wurden nur in 27,6 % der *B. intermedia*-positiven Sammelkotproben und in 35,3 % der *B. murdochii*-positiven Sammelkotproben diese Spezies jeweils mit beiden Untersuchungsmethoden identifiziert. Die

Unterschiede in den beiden Untersuchungsmethoden ließen sich für *B. intermedia* und *B. murdochii* auch statistisch absichern (McNemar-Test, $p < 0,001$). Das heißt der Nachweis von *B. intermedia* erfolgte mittels kultureller Anzucht statistisch signifikant häufiger als mittels PCR-Verfahren. Im Gegensatz dazu führte der Nachweis von *B. murdochii* mit dem PCR-Verfahren zu einem signifikant häufigeren Nachweis als die kulturelle Anzucht.

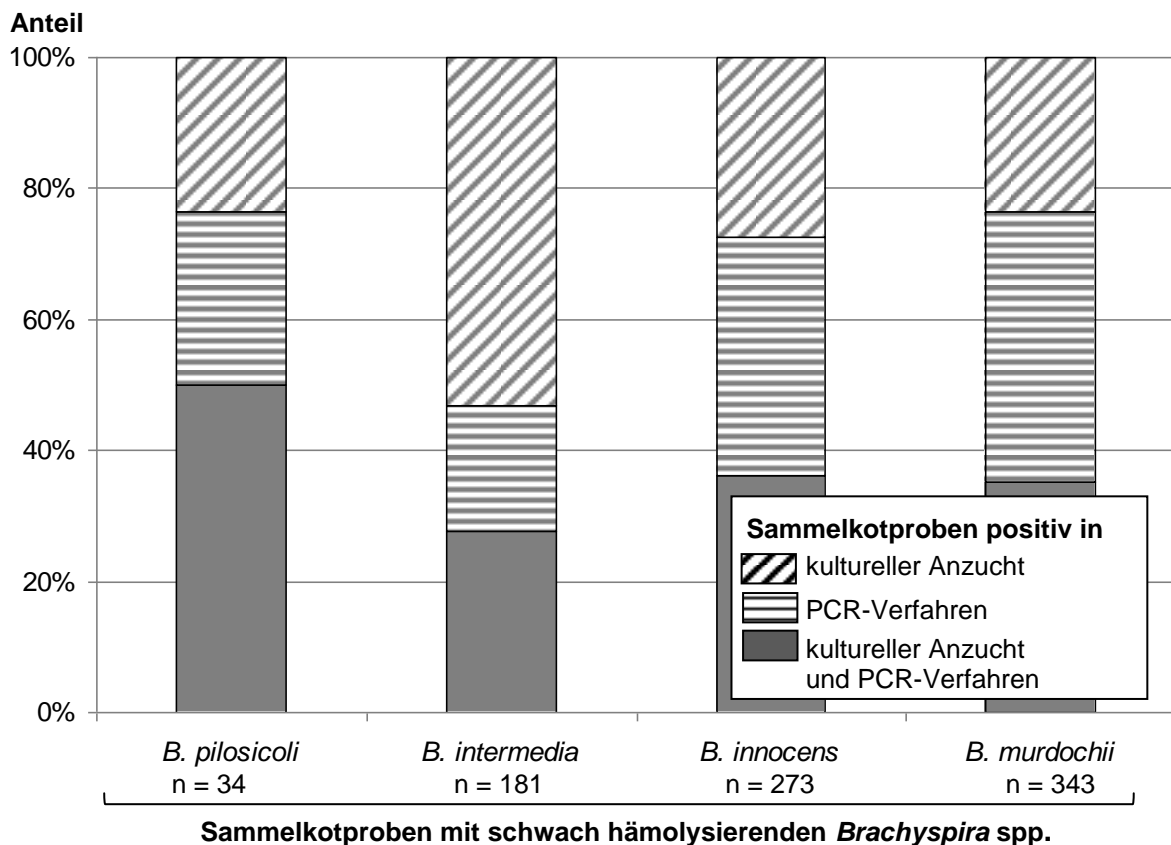


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Untersuchungsverfahren zum Nachweis von schwach hämolysierenden *Brachyspira* in Sammelkotproben.

4.2.1.4 Differenzierung von Mono- und Mischinfektionen mit verschiedenen *Brachyspira* spp.

Legt man beide Untersuchungsverfahren zu Grunde, wurden in 442 Proben (84,2 %) der 525 Sammelkotproben mindestens eine oder mehrere schwach hämolysierende *Brachyspira*-Spezies nachgewiesen. Über Anzahl und Art von nachgewiesenen Mehrfachinfektionen informiert **Tabelle 13**. Insgesamt konnte in 155 Proben (29,5 %) nur eine schwach hämolysierende Spezies identifiziert werden. Monoinfektion mit *B. pilosicoli* traten nicht auf und die Vorkommenshäufigkeit von *B. intermedia* war mit 4,6 % gering. Knapp doppelt so viele Pro-

ben erwiesen sich ausschließlich positiv für *B. innocens* (8,4 %). Am häufigsten wurde *B. murdochii* als alleinige Erreger (16,6 %) nachgewiesen.

Der größte Anteil des Probenmaterials (38,1 %) wies zwei Erreger auf. Mit Abstand am häufigsten war die Kombination mit *B. innocens* und *B. murdochii*. In Verbindung mit *B. intermedia* hatten diese Spezies auch unter den dreifach-positiven Proben den höchsten Anteil (60 von 74 Proben). Ein gleichzeitiger Nachweis aller vier schwach hämolysierenden Brachyspiren trat in 13 Fällen (2,5 %) auf.

Tabelle 13 Einzel- und Mehrfach-Nachweise von schwach hämolysierenden Brachyspiren in Sammelkotproben

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl positiver Sammelkotproben [n (%)]
Einzelnachweise	155 (29,5)
<i>B. murdochii</i>	87
<i>B. innocens</i>	44
<i>B. intermedia</i>	24
Doppelnachweise	200 (38,1)
<i>B. innocens, B. murdochii</i>	124
<i>B. intermedia, B. murdochii</i>	46
<i>B. innocens, B. intermedia</i>	23
<i>B. pilosicoli, B. intermedia</i>	3
<i>B. pilosicoli, B. murdochii</i>	3
<i>B. pilosicoli, B. innocens</i>	1
Nachweis von drei Spezies	74 (14,1)
<i>B. innocens, B. murdochii, B. intermedia</i>	60
<i>B. pilosicoli, B. intermedia, B. murdochii</i>	6
<i>B. pilosicoli, B. innocens, B. murdochii</i>	4
<i>B. pilosicoli, B. intermedia, B. innocens</i>	4
Nachweis aller vier Spezies	13 (2,5)
<i>B. innocens, B. murdochii, B. intermedia, B. pilosicoli</i>	13

4.2.2 Auswertung der Untersuchungen auf Betriebsebene

4.2.2.1 Durch kulturelle Anzucht erfasste Betriebe mit *Brachyspira* spp.-positiven Schweinen

In 150 (87,3 %) der insgesamt 165 untersuchten Betriebe konnten in den von den Schweinen entnommenen Proben schwach hämolysierende Brachyspiren nachgewiesen werden.

Die Spanne zwischen den Vorkommenshäufigkeiten der vier schwach hämolysierenden Brachyspirenspezies ist groß. Wie aus **Tabelle 14** zu entnehmen, wurden in lediglich 14

Betrieben *B. pilosicoli* gefunden, während in knapp mehr als der Hälfte *B. intermedia* und in sogar 60,0 % *B. innocens* detektiert wurde. Der häufigste Befund war *B. murdochii* (64,8 %).

4.2.2.2 Mittels PCR-Verfahren erfasste Betriebe mit *Brachyspira* spp.-positiven Schweinen

Bei dieser Untersuchungsmethode ergab sich ein sehr ähnliches Bild hinsichtlich der Anzahl infizierter Betriebe (87,9 %). Lediglich in 20 Betrieben waren mittels PCR keine schwach hämolysierenden Brachyspiren nachweisbar. Die Vorkommenshäufigkeiten der einzelnen Spezies waren vergleichbar mit den Ergebnissen aus der kulturellen Anzucht. So wurde *B. pilosicoli* am seltensten nachgewiesen (8,5 %). Ebenso waren die Prävalenzen von *B. innocens* (64,2 %) und *B. murdochii* (69,7 %) nahe denen des Vergleichsverfahrens „kulturelle Anzucht“. *B. murdochii* wurde auch bei dieser Untersuchungsmethode am häufigsten nachgewiesen. *B. intermedia* wurde jedoch deutlich seltener detektiert und zwar nur in knapp einem Drittel der Fälle (31,5 %) (**Tabelle 14**).

Tabelle 14 Durch kulturelle Anzucht und PCR-Verfahren ermittelte Betriebe mit *Brachyspira* spp.-positiven Schweinen

Spezies	<i>Brachyspira</i> spp.-positive Betriebe [n (%)]		
	kulturelle Anzucht	PCR-Verfahren	Gesamt
<i>B. pilosicoli</i>	14 (8,5)	14 (8,5)	18 (10,9)
<i>B. intermedia</i>	85 (51,5)	52 (31,5)	95 (57,6)
<i>B. innocens</i>	99 (60,0)	106 (64,2)	131 (79,4)
<i>B. murdochii</i>	107 (64,8)	115 (69,7)	142 (86,1)

4.2.2.3 Gesamtzahl der Betriebe mit *Brachyspira* spp.-positiven Schweinen

Die Gesamtzahl positiver *Brachyspira* spp. Betriebe ergab sich aus der Summe positiver Befunde mittels einer und/oder beider Methoden.

Betriebe mit *B. pilosicoli*-positiven Tieren nahmen mit 10,9 % den geringsten Anteil ein. In über der Hälfte aller Betriebe kamen *B. intermedia* (57,6 %) und noch häufiger *B. innocens* (79,4 %) und *B. murdochii* (86,1 %) vor (**Tabelle 14**). Wie der **Tabelle 14** zu entnehmen ist, war *B. pilosicoli* die einzige Spezies, bei der die beiden Untersuchungsverfahren im Hinblick auf die Anzahl positiver Betriebe vergleichbare Ergebnisse lieferten. Betriebe mit *B. innocens*- und *B. murdochii*-positiven Tieren wurden dagegen mittels PCR-Verfahren geringgradig häufiger identifiziert als durch die kulturelle Anzucht. Im Gegensatz hierzu

wurden Betriebe, in denen *B. intermedia* nachgewiesen wurde, mittels kultureller Anzucht (Nachweisrate von 51,5 %) deutlich häufiger ermittelt als mittels PCR-Verfahren (Nachweisrate von 31,5 %).

Die Ergebnisse aus beiden Untersuchungsverfahren deckten sich in über der Hälfte der Fälle bei *B. pilosicoli* (55,6 %), *B. murdochii* (56,3 %) und *B. innocens* (55,6 %) (**Abbildung 7**). Bei *B. intermedia* waren es hingegen nur 44,2 % der Betriebe, die mittels beider Methoden übereinstimmend identifiziert wurden.

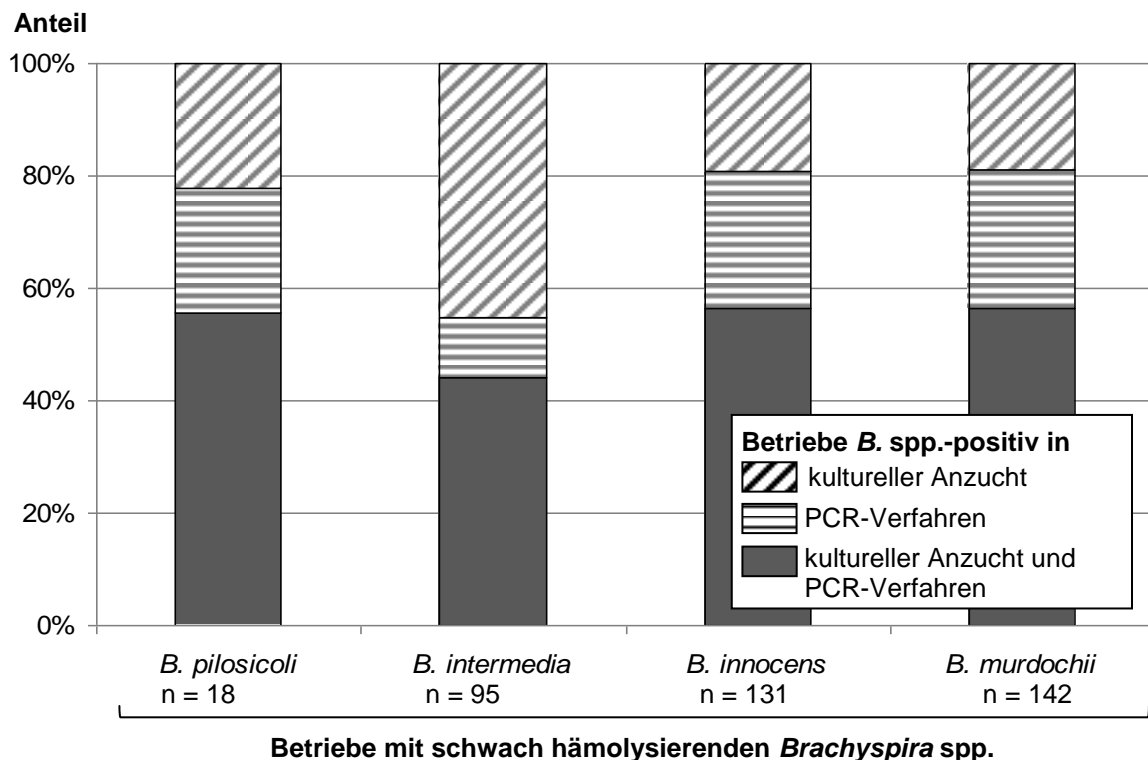


Abbildung 7: Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Untersuchungsverfahren zur Ermittlung von Beständen mit *Brachyspira* spp.-infizierten Tieren

4.2.2.4 Einzel- und Mehrfach-Nachweise von verschiedenen *Brachyspira* spp. auf Betriebsebene

In 158 (95,8 %) der 165 untersuchten Betriebe wurden Schweine mit schwach hämolysierenden Brachyspiren ermittelt. In über 70 % der untersuchten Betriebe konnten nach Einbeziehung der Ergebnisse aus beiden Untersuchungsverfahren zwei oder drei Spezies von schwach hämolysierenden Brachyspiren nachgewiesen werden. Einzelnachweise (13,3 %) und Nachweise von allen vier Spezies (7,9 %) waren hingegen seltener. Als einzige Spezies war *B. pilosicoli* weder bei den nachgewiesenen Einzel- noch bei den Doppel-Nachweisen

beteiligt. Der überwiegende Anteil ($n = 41$) der 57 Betriebe mit zwei nachgewiesenen *Brachyspira* spp. wies eine Kombination aus *B. innocens* und *B. murdochii* auf. Diese beiden Spezies waren zusammen mit *B. intermedia* auch für fast alle Fälle (61 von 66) verantwortlich, in denen drei Spezies in einem Betrieb nachgewiesen wurden. Lediglich in sieben Betrieben (4,2 %) kamen überhaupt keine schwach hämolysierenden Brachyspiren vor (Tabelle 15).

Tabelle 15 Betriebe mit Einzel- und Mehrfach-Nachweisen von schwach hämolysierende Brachyspiren

<i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl positiver Betriebe [n (%)]
Einzelnachweise	22 (13,3)
<i>B. murdochii</i>	15
<i>B. innocens</i>	5
<i>B. intermedia</i>	2
Doppelnachweise	57 (34,5)
<i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	41
<i>B. innocens</i> , <i>B. intermedia</i>	8
<i>B. intermedia</i> , <i>B. murdochii</i>	8
Nachweis von drei Spezies	66 (40,0)
<i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i> , <i>B. intermedia</i>	61
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. murdochii</i>	2
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	2
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i>	1
Nachweis aller vier Spezies	13 (7,9)
<i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. pilosicoli</i>	13

4.2.3 Einfluss von betrieblichen Managementfaktoren (Herkunft der Tiere, Belegungsverfahren, Betriebsgröße, Tierhaltung) auf das Vorkommen von schwach hämolysierenden Brachyspiren in den Betrieben

4.2.3.1 Herkunft der Tiere

Insgesamt 97,0 % der Bestände bezog die Ferkel aus anderen Betrieben und nur 3,0 % betrieben ein geschlossenes System mit eigener Nachzucht. Von den 160 Betrieben, die ihre Ferkel von außerhalb bezogen, bekamen 70,6 % die Tiere von nur einem Ferkelerzeuger, 20,0 % von mehreren Ferkelerzeugern und 9,4 % von einem oder mehreren Händlern (Tabelle 16).

Am seltensten konnten *B. intermedia* und *B. innocens* in denjenigen Betrieben nachgewiesen werden, die ihre Tiere von nur einem Ferkelerzeuger bezogen. *B. pilosicoli* konnte seltener in Betrieben gefunden werden, die über nur einen Ferkelerzeuger (8,0 %) oder über Händler (6,7 %) ihre Tiere nachkauften, dagegen häufiger wenn die Tiere von mehreren

Ferkelerzeugern (21,9 %) oder aus einem geschlossenen System (20,0 %) stammten. *B. murdochii* kam nahezu gleichhäufig in Betrieben mit einem offenen System (84,4 bis 86,7 %) vor und in allen Betrieben mit einem geschlossenen Haltungssystem.

Die Unterschiede in den Prävalenzen einzelner *B. spp.* in Abhängigkeit von der Herkunft der Ferkel waren jedoch nicht statistisch signifikant (Fisher-Test, $p \geq 0,095$).

Tabelle 16 Anzahl der Betriebe mit *Brachyspira spp.*-infizierten Tieren in Abhängigkeit zur Herkunft der Tiere

Spezies	Anzahl der Betriebe [n (%)] mit <i>Brachyspira spp.</i> -infizierten Schweinen				p-Wert [Fischer-Test]
	ein Ferkel- erzeuger [n=113]	mehrere Ferkel- erzeuger [n=32]	Händler [n=15]	geschlos- senes System [n=5]	
<i>B. pilosicoli</i>	9 (8,0)	7 (21,9)	1 (6,7)	1 (20,0)	0,129
<i>B. intermedia</i>	59 (52,2)	21 (65,7)	10 (66,7)	5 (100,0)	0,095
<i>B. innocens</i>	86 (76,1)	28 (87,5)	13 (86,7)	4 (80,0)	0,472
<i>B. murdochii</i>	97 (85,8)	27 (84,4)	13 (86,7)	5 (100,0)	0,827
Gesamt	113 (100,0)	32 (100,0)	15 (100,0)	5 (100,0)	--

4.2.3.2 Belegungsverfahren

Von den untersuchten Betrieben gaben 103 Betriebe (62,4 %) an, ihre Ställe kontinuierlich zu belegen, während 62 Betriebe die Ställe im Rein-Raus-Verfahren (37,6 %) belegten.

Betriebe mit kontinuierlicher Belegung wiesen eine Herdenprävalenz für *B. pilosicoli* von 11,7 %, für *B. intermedia* von 58,3 % und für *B. innocens* von 82,0 % auf. Während bei den Betrieben mit dem Rein-Raus-Verfahren diese drei Brachyspiren-Spezies seltener nachweisbar waren (9,7 %, 56,5 % bzw. 75,8 %), war *B. murdochii* häufiger zu finden (90,3 % gegenüber 83,5 % bei kontinuierlicher Belegung) (**Tabelle 17**). Diese Unterschiede ließen sich allerdings statistisch nicht absichern (Fisher-Test, $p \geq 0,220$).

Tabelle 17 **Anzahl der Betriebe mit *Brachyspira* spp.-infizierten Tieren in Abhängigkeit vom Belegungsverfahren**

Spezies	Anzahl der Betriebe [n (%)] mit <i>Brachyspira</i> spp.-infizierten Schweinen		p-Wert [Fischer-Test]
	kontinuierliche Belegung [n=103]	Rein-Raus-Verfahren [n=62]	
<i>B. pilosicoli</i>	12 (11,7)	6 (9,7)	0,694
<i>B. intermedia</i>	60 (58,3)	35 (56,5)	0,821
<i>B. innocens</i>	84 (82,0)	47 (75,8)	0,377
<i>B. murdochii</i>	86 (83,5)	56 (90,3)	0,220

4.2.3.3 Betriebsgröße

Die untersuchten Betriebe wurden in sechs Gruppen, abhängig von der Anzahl gehaltener Schweine, eingeteilt. Über die Hälfte (56,4 %) der 165 Bestände hatten weniger als 250 Tiere (Gruppen I und II), dagegen hielten nur drei Betriebe mehr als 2000 Tiere (Gruppe VI).

Betriebe, die weniger als 100 Schweine hielten (Gruppe I), besaßen am seltensten Tiere, die mit *Brachyspira* spp. infiziert waren. So lagen die ermittelten Herdenprävalenzen für die vier schwach hämolysierenden Brachyspiren-Spezies *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii* (4,5 %, 40,9 %, 70,5 % und 75,0 %) unter den Angaben der jeweiligen Gesamtprävalenz (10,9 %, 57,6 %, 79,4 % und 86,1 %) (**Abbildung 8**). Im Hinblick auf den Nachweis von *B. pilosicoli*, *B. intermedia* und *B. innocens* ließ sich in keinem Fall ein Zusammenhang mit der Betriebsgröße feststellen (**Abbildung 8**). Allein für die Diagnose *B. murdochii* ließ sich ein leichter Trend erkennen, dass dieser Erreger in Betrieben mit einer großen Anzahl an Tieren häufiger vorkommt, als in Betrieben mit weniger Tieren. Allerdings ließ sich dieser Trend statistisch nicht bestätigen (Fisher-Test, *B. pilosicoli* p = 0,069, *B. intermedia* p = 0,102, *B. innocens* p = 0,440, *B. murdochii* p = 0,098).

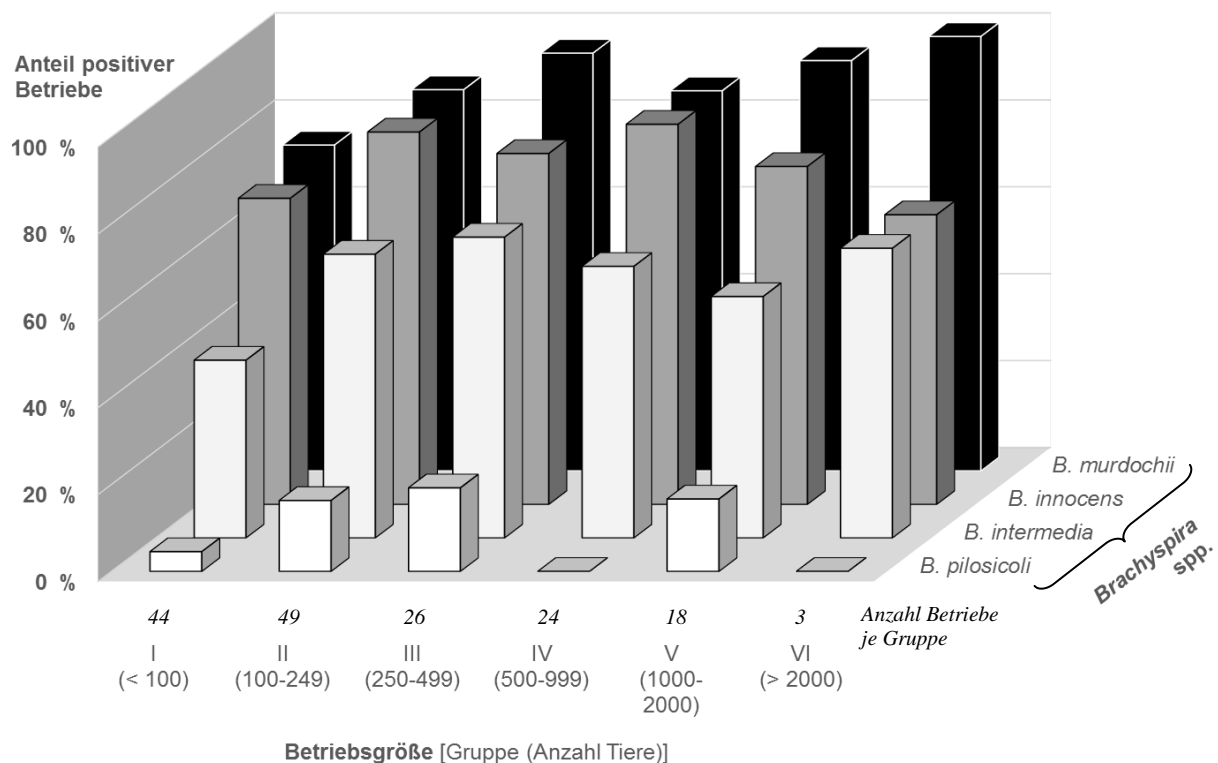


Abbildung 8: Verteilung der untersuchten Betriebe mit *Brachyspira* spp.-infizierten Tieren nach der Anzahl gehaltener Schweine

4.2.3.4 Tierhaltung

Von allen 165 untersuchten Beständen betrieben sieben (4,2 %) eine ökologische (zertifiziert nach Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates vom 28. Juni 2007), die übrigen 158 Bestände (95,8 %) eine konventionelle Tierhaltung.

Unter den Betrieben mit einer ökologischen Tierhaltung belief sich die Prävalenz von Beständen mit *B. pilosicoli*-positiven Schweinen auf 42,9 %, bei *B. innocens* auf 71,4 % und bei *B. intermedia* und *B. murdochii* jeweils auf 57,1 % (**Tabelle 18**). Somit waren - mit Ausnahme von *B. pilosicoli* - Betriebe mit einer ökologischen Haltung seltener von Infektionen mit schwach hämolysierenden Brachyspiren betroffen als solche mit einer konventionellen Tierhaltung. Der häufigere Nachweis von *B. pilosicoli* bei Betrieben mit einer ökologischen Tierhaltung war ebenso signifikant (Fisher-Test, $p = 0,006$) wie der von *B. murdochii* (Fisher-Test, $p = 0,024$) in Betrieben mit einer konventionellen Haltung.

Tabelle 18 **Anzahl der Betriebe mit *Brachyspira* spp.-infizierten Tieren in Abhängigkeit von der Haltungsform**

Anzahl der Betriebe [n (%)] mit <i>Brachyspira</i> spp.-infizierten Schweinen			
Spezies	Betriebe mit ökologischer Haltungsform [n=7]	Betriebe mit konventioneller Haltungsform [n=158]	p-Wert [Fischer-Test]
<i>B. pilosicoli</i>	3 (42,9)	15 (9,5)	0,006
<i>B. intermedia</i>	4 (57,1)	91 (57,6)	0,981
<i>B. innocens</i>	5 (71,4)	126 (79,7)	0,594
<i>B. murdochii</i>	4 (57,1)	138 (87,3)	0,024

4.3 Vergleichende Analyse der Nachweisraten schwach-hämolysierender Brachyspiren bei Schweinen mit und ohne Diarrhoe

4.3.1 Auswertung der Sammelkotproben

In insgesamt 70 der 525 untersuchten Buchten waren Tiere mit Durchfall zu finden. In den Sammelkotproben aus 65 der 70 Buchten mit durchfallkranken Tieren (92,9 %) waren schwach hämolysierende Brachyspiren ermittelbar. *B. murdochii* wurde mit 62,9 % am häufigsten festgestellt (**Tabelle 19**). Diese Spezies war zudem die einzige der vier schwach hämolysierenden Brachyspiren-Spezies, die in Sammelkotproben von Tieren mit Durchfall seltener als in den Sammelkotproben von gesunden Tieren auftrat. Allerdings ergaben sich sowohl für *B. murdochii* als auch *B. innocens* keine signifikanten Unterschiede bei den Prävalenzwerten zwischen den Proben von durchfallkranken und gesunden Tieren (Chi²-Test, $p \geq 0,640$). *B. pilosicoli* wurde zwar am seltensten ermittelt, jedoch auffallend häufiger (17,1 %) in Proben von Tieren mit als ohne Durchfallsymptomatik (4,8 %) (Chi²-Test, $p < 0,001$). Auch für *B. intermedia* trifft dieser signifikante Unterschied hinsichtlich einer erhöhten Prävalenz in Proben, die aus Buchten mit durchfallkranken Tieren stammten, zu ($p = 0,008$).

Tabelle 19 Nachweis schwach hämolysierender *Brachyspira* in Sammelkotproben von Tieren mit bzw. ohne Durchfall

Spezies	<i>Brachyspira</i> spp.-positive Sammelkotproben [n (%)]		p-Wert [Chi ² -Test]
	durchfallkranke Tieren [n = 70]	nicht durchfallkranke Tiere [n = 455]	
<i>B. pilosicoli</i>	12 (17,1)	22 (4,8)	< 0,001
<i>B. intermedia</i>	34 (48,6)	147 (32,3)	0,008
<i>B. innocens</i>	37 (52,9)	236 (51,9)	0,878
<i>B. murdochii</i>	44 (62,9)	299 (65,7)	0,640
schwach hämolysierende <i>B. spp. gesamt</i>	65 (92,9)	377 (82,9)	n. b.

Erläuterung: n. b. = nicht bestimmt.

4.3.1.1 Einzel- und Mehrfachnachweise von verschiedenen *Brachyspira* spp.

Während bei Sammelkotproben aus Buchten mit durchfallkranken Tieren zu nahezu gleichen Anteilen nur ein bzw. zwei *B. spp.* nachgewiesen wurden (35,7 % bzw. 32,9 %) dominierten bei den Sammelkotproben aus Buchten mit gesunden Tieren die Doppelnachweise (38,9 %) (**Tabelle 20**). Insgesamt kamen in den Sammelkotproben von durchfallkranken Tieren am häufigsten *B. murdochii*-Monoinfektionen (20,0 %) vor. In den Sammelkotproben von gesunden Tieren dominierten dagegen Doppelinfektionen mit *B. innocens* und *B. murdochii* (30,0 %), eine Kombination die in den Sammelkotproben von durchfallkranken Tieren nur bei 16,9 % vorkam. Bei der Betrachtung der Monoinfektionen fiel der Nachweis von *B. intermedia* mit 8,6 % in den Sammelkotproben durchfallkranker gegenüber 4,8 % in den Sammelkotproben gesunder Tiere auf. Die übrigen Kombinationen traten zu ähnlichen Anteilen in beiden Probenkollektiven auf.

Tabelle 20 Nachgewiesene Einzel- und Mehrfach-Nachweise von schwach hämolysierenden Brachyspiren in Sammelkotproben aus Buchten mit durchfallkranken Tieren

Kombination der nachgewiesenen schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp.	Sammelkotproben [n (%)]	
	von durchfallkranken Tieren [n = 65]	von Tieren ohne Durchfall [n = 377]
Einzelnachweise	25 (35,7)	130 (28,6)
<i>B. intermedia</i>	6	18
<i>B. innocens</i>	6	38
<i>B. murdochii</i>	13	74
Doppelnachweise	23 (32,9)	177 (38,9)
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i>	1	2
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. innocens</i>	1	0
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. murdochii</i>	0	3
<i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i>	4	19
<i>B. intermedia</i> , <i>B. murdochii</i>	6	40
<i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	11	113
Nachweis dreier Spezies	13 (18,6)	61 (13,4)
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i>	3	1
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. murdochii</i>	2	4
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	1	3
<i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	7	53
Nachweis aller vier Spezies	4 (5,7)	9 (2,0)
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	4	9

4.3.2 Auswertung der Untersuchungen auf Betriebsebene

In 49 (29,7 %) der 165 untersuchten Betriebe wurden durchfallkranke Tiere ermittelt. In allen diesen Beständen waren auch bei den Schweinen schwach hämolysierende Brachyspiren nachweisbar. In Betrieben ohne durchfallkranke Tiere waren in 7 Betrieben (6,0 %) bei keinem der Schweine schwach hämolysierende Brachyspiren nachweisbar.

Das Auftreten von *B. pilosicoli* (24,5 %) in Beständen mit durchfallkranken Tieren war signifikant höher als in Beständen ohne durchfallkranke Tiere (Chi²-Test, $p < 0,001$). Die erhöhte Nachweisrate von *B. intermedia* und *B. innocens* in Betrieben mit durchfallkranken Tieren war dagegen nicht signifikant (Chi²-Test, $p \geq 0,099$). Das Vorkommen von *B. murdochii* in Betrieben mit durchfallkranken Tieren (81,6 %) unterschied sich dagegen kaum von jenem in Betrieben ohne diese Problematik (88,0 %) (**Tabelle 21**).

Tabelle 21 *Brachyspira* spp. positive Betriebe mit und ohne durchfallkranken Schweine

Spezies	<i>Brachyspira</i> spp.-positive Betriebe [n (%)]		p-Wert [Chi ² -Test]
	mit durchfallkranken Tieren [n = 49]	ohne durchfallkranke Tiere [n = 116]	
<i>B. pilosicoli</i>	12 (24,5)	6 (5,2)	< 0,001
<i>B. intermedia</i>	33 (67,3)	62 (53,4)	0,099
<i>B. innocens</i>	42 (85,7)	89 (76,7)	0,192
<i>B. murdochii</i>	40 (81,6)	102 (88,0)	0,286
schwach hämolysierende <i>B. spp. gesamt</i>	49 (100)	109 (94,0)	n. b.

Erläuterung: n. b. = nicht bestimmt.

4.3.2.1 Einzel- und Mehrfachnachweise von verschiedenen *Brachyspira* spp.

In nur insgesamt fünf (10,2 %) der Betriebe mit durchfallkranken Tieren lagen Monoinfektionen mit entweder *B. innocens* (n=2) oder *B. murdochii* (n=3) vor (**Tabelle 22**). Die Spezies *B. pilosicoli* und *B. intermedia* kamen nur in Kombination mit anderen schwach hämolysierenden Brachyspiren als Mischinfektionen vor. Den größten Anteil der Mischinfektionen stellten mit jeweils 36,7 % die Doppel- und Dreifachinfektionen dar. Unter den Doppelinfektionen war die Kombination *B. innocens* mit *B. murdochii* am häufigsten vertreten. Zusammen mit *B. intermedia* bildeten diese Spezies die häufigste Konstellation (14 von 18 Fällen) der Dreifachinfektionen. Eine Infektion mit allen vier schwach hämolysierenden Brachyspiren wurde in acht Betrieben diagnostiziert (16,3 %) (**Tabelle 22**).

Tabelle 22 Einzel- und Mehrfachnachweise von schwach hämolysierenden Brachyspiren in Betrieben mit bzw. ohne durchfallkranke Tiere

Kombination der nachgewiesenen schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp.	Anzahl Betriebe [n (%)]	
	mit durchfall-kranken Tieren	ohne durchfall-kranke Tiere
Einzelnachweise	5 (10,2)	17 (14,7)
<i>B. intermedia</i>	0	2
<i>B. innocens</i>	2	3
<i>B. murdochii</i>	3	12
Doppelnachweise	18 (36,7)	39 (33,6)
<i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i>	6	2
<i>B. intermedia</i> , <i>B. murdochii</i>	3	5
<i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	9	32
Nachweis dreier Spezies	18 (36,7)	48 (41,4)
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i>	1	0
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. murdochii</i>	1	1
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	2	0
<i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	14	47
Nachweis aller vier Spezies	8 (16,3)	5 (4,3)
<i>B. pilosicoli</i> , <i>B. intermedia</i> , <i>B. innocens</i> , <i>B. murdochii</i>	8	5

4.3.3 Differentialdiagnostisch-mikrobiologische Untersuchungen in Betrieben mit durchfallkranken Tieren

Neben der Untersuchung auf das Vorhandensein schwach hämolysierender Brachyspiren, wurden die Sammelkotproben aus Betrieben mit dem Befund Durchfall bei Schweinen zusätzlich auf *B. hyodysenteriae*, pathogene *E. coli*, *L. intracellularis* und Salmonellen untersucht.

In knapp einem Drittel (30,6 %) der Bestände mit durchfallkranken Tieren waren keine weiteren der untersuchten Bakterien detektierbar. Bei weiteren 30,6 % konnte *L. intracellularis* in den Kotproben nachgewiesen werden. Weiterhin wurden in 7 Herden (14,3 %) *B. hyodysenteriae* und in 2 von 44 untersuchten Betrieben *Salmonella enterica* ssp. *enterica* (Gruppe B) diagnostiziert. In Betrieben, in denen durchfallkranke Tiere vorkamen, war die Prävalenz von *B. hyodysenteriae* höher (14,3 %) als in Betrieben ohne solche Tiere (8,6 %). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Chi²-Test, p = 0,078). Darüber hinaus wurde von Schweinen aus 22 der 49 untersuchten Betriebe hämolysierende *E. coli* isoliert. Insgesamt sieben dieser Isolate konnten anhand ihrer Virulenzprofile den Pathovaren EDEC (n=2), ETEC (n=2) bzw. EPEC (n=3) zugeordnet werden (**Tabelle 23**).

Tabelle 23 **Ergebnis der differentialdiagnostisch-mikrobiologischen Untersuchung**

Betrieb(e) Nr.	Nachweis anderer differentialdiagnostisch relevanter Bakterien in Betrieben mit durchfallkranken Schweinen			
	<i>B. hyodys- enteriae</i>	<i>E. coli</i> (Pathovar) ¹	<i>L. intra- cellularis</i>	<i>Salmonella</i> sp.
1	+	n.t.	-	n.t.
5, 6, 36	-	n.t.	-	n.t.
19	-	n.t.	+	n.t.
28, 81	+	-	+	-
49, 56, 63, 96, 104, 120, 133, 134, 151, 153, 156, 160, 162, 167, 178	-	-	-	-
78, 152	+	-	-	-
68, 83, 94, 127, 136, 175	-	+ (n.b.)	-	-
73, 146	-	+ (ETEC)	-	-
163	-	+ (EDEC)	-	-
168, 170	-	+ (EPEC)	-	-
89, 107, 111, 113, 116, 147, 149, 155	-	-	+	-
92	+	+ (n.b.)	-	-
53	-	+ (n.b.)	+	-
171	-	+ (EPEC)	+	-
115	-	+ (n.b.)	-	+
82	+	+ (n.b.)	+	-
132	-	+ (EDEC)	+	+

Erläuterungen: + = positiv, d.h. Erreger in Sammelkotproben aus dem Betrieb nachweisbar; - = negativ, d.h. Erreger in Sammelkotproben aus dem Betrieb nicht nachweisbar; **n.t.** = nicht getestet, d.h. aus dem Betrieb wurden keine Sammelkotproben auf den Erreger untersucht;

1) *E. coli* = hämolysierende *Escherichia coli*. *E. coli*-Isolate wurden mittels PCR auf Zugehörigkeit zu bestimmten Pathovaren getestet: **EDEC** = enterotoxämische *E. coli* (Nachweis von Shigatoxin Typ 2e [*stx2e*] und F18-Fimbrien [*fedA*]); **EPEC** = enteropathogene *E. coli* (Nachweis von Intimin [*eae*]); **ETEC** = enterotoxische *E. coli* (Nachweis von Enterotoxin [*elt*, *estap* und/oder *estb*] und Fimbrien [*faeG*, *fanA*, *fasA*, *fedA* und/oder *fim41A*]); + **n.b.** = hämolysierende *E. coli*, Virulenzgenmuster erlaubt keine Zuordnung zu einem der bekannten Pathovare.

5 Diskussion

Zu dem Thema „schwach hämolysierende Brachyspiren beim Schwein“ liegen weltweit eine Reihe von Berichten vor. Vorrangig ist das Vorkommen und die Verbreitung dieser Brachyspiren Gegenstand der Untersuchungen. Entgegen den Erwartungen lassen die Daten jedoch in Anbetracht oft selektiver Annäherungsversuche an das Thema selten Rückschlüsse auf die Prävalenz zu. Die vorliegende Arbeit sollte dazu dienen, die Prävalenz von schwach hämolysierenden Brachyspiren bei Mastschweinen zu bestimmen. Hierzu wurden im Gebiet Nordhessen Kotproben von Schweinen in einer statistisch repräsentativen Anzahl bezogen auf Schweine und Herden entnommen und auf das Vorkommen von schwach hämolysierenden Brachyspiren (*B. innocens*, *B. intermedia*, *B. murdochii* und *B. pilosicoli*) untersucht. Das Ergebnis der Untersuchungen überraschte. Infektionen mit diesen Erregern sind bei Schweinen augenscheinlich sehr häufig. Von den untersuchten Sammelkotproben waren 84,2 % positiv und von den Betrieben 95,8 %.

Prävalenzen haben einen Wert, der je nach Auswahl der Methodik genau, annäherungsweise oder nicht annäherungsweise über oder unter dem wahren Wert liegen kann. Bei Versuchen zum Erregernachweis dürfte der bestimmte Wert selten über dem wahren Wert liegen, d. h. falsch positive Ereignisse sind weniger wahrscheinlich als z. B. in der von Kreuzreaktionen betroffenen Serologie. Dies trifft insbesondere für die in den vorliegenden Untersuchungen ausgewählten, sehr spezifischen Nachweisverfahren in der Brachyspiren-Diagnostik zu, wie die PCR und die kulturelle Untersuchung. Auch in Anbetracht der ermittelten sehr hohen Prävalenzrate ist davon auszugehen, dass das Ergebnis zwar unter dem wahren Wert liegt, aber in Anbetracht seiner Höhe dem wahren Wert sehr nahe kommt. Maximal könnte der ermittelte Wert den wahren Wert (der wahre Wert kann 100 % nicht überschreiten) theoretisch nur um 15,8 % unterschreiten. Insgesamt machen diese Überlegungen eine Prävalenzrate schwach hämolysierender Brachyspiren von 84,2 % sehr realistisch, auch wenn sich dieses Ergebnis sehr deutlich von jenen aus anderen Untersuchungen abhebt. In der Literatur wird stets von einer deutlich niedrigeren Prävalenz (höchstens 49,2 % der Proben bzw. 82 % der Betriebe) berichtet (Jacobson et al., 2005; Heinonen et al., 2000). Dies beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf einer Reihe von unterschiedlichen Faktoren, die bei der Interpretation von Prävalenzdaten zu berücksichtigen sind. Hierzu gehören die Auswahl des Probenmaterials, die Menge und die Entnahmeart der Probe (Biksi et al., 2007; Hommez et al., 1998; Merialdi et al., 2003; Reiner et al., 2011a). Auch der Zeitpunkt der Probenentnahme ist bedeutsam. So ist bekannt, dass infizierte Tiere die Erreger auch diskontinuierlich (Stegel et al., 2000; Verspohl et al., 2001) ausscheiden können. Ebenso sind unterschiedliche Betriebsparameter (Haltungsform, Fütterungsregime, Management), die wiederum Einfluss auf den Grad der Übertragung von Brachyspiren

zwischen und innerhalb von Herden haben können (Jacobson et al., 2005), zu berücksichtigen. Es muss zudem bedacht werden, dass die Anwendung von Leistungsförderern in vielen nicht-europäischen Ländern weiterhin erlaubt ist, was einen Vergleich ebenfalls erschwert, da diese einen (negativen) Einfluss auf die Prävalenz von *B. spp.* haben können (Hampson und Duhamel, 2006). Einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg diagnostischer Verfahren zum Nachweis von Brachyspiren und damit auf die Prävalenz hat anscheinend aber die methodische Vorgehensweise, was an Hand der Vielzahl verwendeter diagnostischer Methoden mit unterschiedlichen Ergebnissen offensichtlich wird (Fellström et al., 1996; Fellström et al., 2001b; Rasbäck et al., 2005). Diese Kenntnisse bildeten die Grundlage für die Etablierung des Untersuchungsgangs im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen. Neben der Optimierung durch einen günstigen Zeitpunkt für die Untersuchung (möglichst am Anfang der Mastperiode), einen zügigen Transport (innerhalb von 8 h) der Proben in das Labor und nachfolgender umgehender kultureller Anzucht und der Auswahl einer ausreichenden (repräsentativen) Anzahl von Proben, ist vor allem die duale Strategie zum Erregernachweis als ein entscheidender Faktor zu benennen, durch die sich die vorliegende Studie von anderen Untersuchungen in ihrer Aussagefähigkeit deutlich abhebt. Durch die gleichzeitige Anwendung von Methoden, die auf unterschiedlichen Nachweisprinzipien basieren erhöht sich insgesamt die Sensitivität. Nachteile der Techniken gleichen sich gegenseitig aus. Beispielsweise können die Brachyspiren durch ungünstige Milieubedingungen inaktiviert worden sein, was bei kultureller, jedoch nicht bei Untersuchung mittels PCR zu einem negativen Ergebnis führen würde. Umgekehrt ergänzt der sehr sensitive kulturelle Ansatz die weniger sensitive PCR-Technik zum direkten Nachweis von Brachyspiren in Kotproben. Mögliche Ursachen für einen negativen Ausgang der einzelnen Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Bei der **kulturellen Untersuchung** war in 27 % der hier untersuchten Proben keine Anzucht von schwach hämolysierenden Brachyspiren möglich. Es bleibt offen, ob die Erreger nach der Probeentnahme bis zum Untersuchungszeitraum abgestorben waren, oder keine Erreger in den Proben enthalten waren. Obwohl alle Proben in der Regel innerhalb von 8 Stunden das Labor erreichten und umgehend auf Nährböden ausgestrichen wurden, könnten dennoch in einzelnen Fällen transportbedingte Milieuänderungen zu einem Verlust der Vermehrungsfähigkeit der Bakterien geführt haben. Nicht auszuschließen ist ebenfalls ein Unterschreiten der Nachweisgrenze im Hinblick auf die ausgeschiedenen Brachyspiren zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Stege et al., 2000). In weiteren 20 Fällen war die kulturelle Untersuchung zwar positiv, jedoch ließen sich die Isolate mit den beschriebenen Duplex-PCRs nicht identifizieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass zu wenig Brachyspirenmaterial in den Duplex-PCRs zum Einsatz gekommen ist bzw. deren Menge möglicherweise unterhalb der

Nachweisgrenze der PCR gelegen hat (Komarek et al., 2009), ist gering, da nach der Anzucht Bakterien-DNS in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Hier könnte nur über weitere Untersuchungen (z.B. DNS-Sequenzierung) versucht werden abzuklären, ob es sich tatsächlich um Brachyspiren handelte.

Bei Anwendung der **Monoplex-PCRs** zum Nachweis von Brachyspiren in aus Kotproben extrahierter DNS wurden mehr positive Ergebnisse erzielt als bei kulturellen Untersuchung der Proben, obwohl die Bedingungen für letztere als außerordentlich günstig zu beurteilen waren. Dieser Befund deckt sich aber mit Berichten zu entsprechenden Untersuchungen auf *B. pilosicoli* (La et al., 2003). Offensichtlich führt der Transport der Proben im Amies-Medium für maximal 8 Stunden doch häufiger zum Vitalitätsverlust der Brachyspiren als erwartet wurde. Für eine erfolgreiche kulturelle Untersuchung ist das Vorhandensein vitaler Brachyspiren erforderlich (Herzog et al., 2005). Mittels PCR können dagegen auch nicht mehr vermehrungsfähige Brachyspiren detektiert werden. Da für die Kultivierung der Brachyspiren stets Selektivplatten verwendet wurden, darf, obwohl hierüber nichts bekannt ist, nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass in Einzelfällen auch Brachyspiren durch die im Selektivmedium verwendeten Antibiotika in der Vermehrung gehemmt wurden. Letztendlich muss auch diskutiert werden, inwieweit Kontaminationen zu der höheren Zahl PCR-positiver Proben beigetragen haben könnten. DNS-Kontaminationen sind eine große Gefahr für derart leistungsfähige Vervielfältigungstechniken wie die PCR. Da diese Risiken bekannt sind, wurden die vorliegenden Untersuchungen gemäß besonderen, im Institut etablierten, Hygienevorgaben durchgeführt. Zentrale Maßnahmen sind die strikte Trennung von Arbeitsbereichen, die Reinigung, Desinfektion und die Pipettierung der Templates zu den PCR-Mix in zuvor mit UV-Licht bestrahlten Kabinen. Somit dürften Kontaminationen als Ursache für die Zahl der positiven Proben weitgehend auszuschließen sein.

Bezogen auf die einzelnen Spezies waren bis auf *B. intermedia* insgesamt weniger Proben beim Anzuchtverfahren positiv als im Direktverfahren mittels PCR. Somit ist beispielsweise die *B. pilosicoli*-PCR mit einer Nachweisgrenze von mit 10^4 Zellen/ml eine durchaus sensitive Technik. Dagegen ist die Tatsache, dass für *B. intermedia* ein deutlich sensitiveres Ergebnis in der Anzucht ermittelt wurde als beim PCR-Direktverfahren, nicht zu erklären. Schließlich entsprach die Nachweisgrenze der *B. intermedia*-PCR jener von *B. pilosicoli*.

Die diskutierten Befunde belegen eindeutig, dass die **Kombination beider Untersuchungsverfahren (duale Strategie)** eine vollkommen richtige Entscheidung im Hinblick auf eine möglichst hohe Sensitivität war. Dies erklärt sich durch die niedrige Übereinstimmung von positiven Proben was folglich bei der Addition der Ergebnisse beider Verfahren zu einem höheren, sehr wahrscheinlich auch dem wahren Wert näherem, Prävalenzwert führte, als bei Nutzung lediglich einer der beiden Methoden zum Brachyspirennachweis. Ähnliche

Zusammenhänge wurden auch von anderen Untersuchern beschrieben, die duale Techniken benutzten (z.B. Anzucht und PCR oder Anzucht und Immunfluoreszenz) (Komarek et al., 2009; La et al., 2003; Rasbäck et al., 2006; Waldmann et al., 2000).

Einfach- und Mehrfachnachweise von schwach hämolysierenden Brachyspiren

Die am häufigsten nachgewiesenen Monoinfektionen waren solche mit *B. murdochii* sowie mit *B. innocens* bzw. bei den Doppelinfektionen die Kombination dieser beiden Spezies. Dieser Befund wird durch die Tatsache, dass diese beiden *B. spp.* die in der vorliegenden Studie sowieso am häufigsten nachweisbaren Brachyspiren waren, leicht erklärlich. Vierfachinfektionen traten selten auf, was sich auch mit den Ergebnissen von Komarek et al. (2009) deckt. Eine in der hier vorliegenden Arbeit ermittelte derart hohe Prozentzahl an Mischinfektionen (82,4 % der Betriebe bzw. 45,3 % der Sammelkotproben) wurde von anderen Untersuchern jedoch bisher nicht beschrieben. Die wenigen in der Literatur genannten Vorkommenshäufigkeiten zu Mehrfachinfektionen waren stets niedriger (bis zu 12,7 % der Betriebe bzw. 37,1 % der Sammelkotproben) (Komarek et al., 2009; Rohde et al., 2002; Stege et al., 2000) als diejenigen in der hier vorliegenden Studie. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die schwach hämolysierenden Brachyspiren bei einem gemeinsamen Auftreten unterdiagnostiziert werden können. Dies könnte durch eine unterschiedlich starke Vermehrung verschiedener Spezies verursacht werden, die schließlich zur Verdrängung einer der Spezies führen könnte (Komarek et al., 2009; Mikosza et al., 1999). Auch die hohen Prävalenzergebnisse beim kulturellen Untersuchungsverfahren für *B. murdochii* könnten dadurch erklärt werden. So sind andere *B. spp.* möglicherweise anspruchsvoller und werden nur bzw. eher mit PCR-Verfahren direkt aus den Kotproben detektiert (Møller et al., 1998). Weiterhin ist bei älteren Untersuchungen zu berücksichtigen, dass sich diese vorwiegend auf den kulturellen Nachweis mit anschließender biochemischer Differenzierung der Isolate stützten. Hierbei dürften Mehrfachinfektionen weitaus schwieriger nachzuweisen sein als mit den derzeit üblichen PCR-basierten Verfahren zur Differenzierung der *Brachyspira* spezies (Fellström et al., 1996; Fellström et al., 2001b; Rasbäck et al., 2005).

Einfluss verschiedener Betriebsparameter auf die Nachweisraten schwach hämolysierender Brachyspiren

Die Analyse von Betriebsparametern im Hinblick auf ihren möglichen Einfluss auf das Vorkommen von schwach hämolysierenden Brachyspiren ist außerordentlich komplex und gereicht den Ansprüchen an eine statistisch gesicherte Untersuchung sicherlich nur sehr unvollkommen. Hierbei ist anzuführen, dass die Studie auch nicht zu diesen Zwecken ausgerichtet und entsprechend konzipiert worden war. Dennoch sollen einige interessante Zusammenhänge zur Diskussion gestellt werden.

In Bezug auf die **Herkunft** der Tiere schienen jene Betriebe weniger häufig von Brachyspireninfektionen betroffen zu sein, die ihre Ferkel nur von einem statt von mehreren Erzeugern bezogen. Auch wenn sich diese Unterschiede statistisch nicht absichern ließen, belegt dieser Trend jedoch, dass eine Reduktion der Herkunftsbetriebe eine bedeutsame Rolle bei der Minimierung von Brachyspireninfektionen spielen kann. Stress infolge von Neuzusammensetzungen von Tieren bleibt ebenso aus wie das Zusammentreffen von Tieren aus verschiedenen Herkunftsbetrieben mit unterschiedlichen hygienischen Bedingungen, Keimspektren und/oder unterschiedlichem Immunstatus (Prange, 2004). Es wird auch die Gefahr minimiert, dass klinisch unauffällige, jedoch Brachyspiren ausscheidende Tiere (sogenannte „Carrier“) in den Bestand gelangen und als Infektionsquelle für die übrigen Tiere dienen können (Hampson, 2012). Dies wurde speziell für Infektionen mit *B. pilosicoli* beim Kauf von Ferkeln von unterschiedlichen Erzeugern gezeigt (Zeeh et al., 2009). Andererseits bergen geschlossene Systeme auch die Gefahr einer permanenten Erregerverbreitung bis in die Mast (Prange, 2004). Und es ist bekannt, dass klinisch inapparent infizierte Sauen Brachyspiren ausscheiden und diese an ihre Ferkel übertragen können (Waldmann and Wendt, 2004).

Was die **Modalitäten der Neubelegung** betrifft, waren erwartungsgemäß Betriebe mit kontinuierlicher Belegung tendenziell häufiger von Infektionen mit schwach hämolysierenden Brachyspiren (mit Ausnahme von *B. murdochii*) betroffen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Stege et al. (2001), die ein gesteigertes Infektionsrisiko für schwach hämolysierende Brachyspiren bei einer kontinuierlichen Belegung nachwiesen. Sehr wahrscheinlich ist die erhöhte Prävalenz von Betrieben mit kontinuierlichem Belegungsverfahren durch bekannte Hygienemängel, die zwangsläufig mit diesem Verfahren einhergehen, zu erklären. Gemeint sind Probleme bei der Reinigung und Desinfektion im belegten Stall (Busch et al., 2004), die es auch den relativ widerstandsfähigen Brachyspiren erlauben in der Umwelt zu überleben und folglich eine Quelle für weitere bzw. für Reinfektionen darstellen (Hampson, 2012).

Die **Betriebsgröße** und Prävalenz waren umgekehrt proportional, bzw. kleine Betriebe (<100 Schweine) waren seltener von Infektionen mit schwach hämolysierenden Brachyspiren betroffen. Eine Erklärung könnte in der möglicherweise damit einhergehenden geringeren Tierdichte liegen. Dadurch ergibt sich auch ein verminderter Erregerdruck, welcher einer Infektionsausbreitung entgegen wirkt (Prange, 2004). So ist beispielsweise für das Risiko einer Salmonelleninfektion bekannt, dass dieses mit zunehmender Anzahl an Tieren im Betrieb steigt und sich damit ein Zusammenhang zwischen der Betriebsgröße und dem Anteil positiver Bestände herstellen lässt (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2009). Entgegen dieser Beobachtung war nach Stege et al. (2001) keine signifikante Assoziation zwischen der

Herdengröße und dem Auftreten der untersuchten Erreger (*B. spp.*, *L. intracellularis*, *E. coli*) vorhanden. Die Autoren gaben aber zu bedenken, dass eine größere Anzahl an Proben nötig wäre, um ihre Aussage statistisch belegen zu können.

Ein weiterer sehr interessanter Diskussionspunkt ist die Frage, ob sogenannte **Biobetriebe** besondere Auffälligkeiten im Hinblick auf Infektionen mit schwach hämolysierenden Brachyspiren aufweisen. Leider waren, bedingt durch die äußerst geringe Anzahl ($n = 7$) dieser Betriebe, Rückschlüsse auf das Auftreten schwach hämolysierender Brachyspiren nur schwer zu ziehen, obwohl die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Prävalenz bei „Biobetrieben“ mit 85,7 % signifikant um 10,5 % unter der von konventionell wirtschaftenden Betrieben lag. Möglicherweise verhindert das größere Platzangebot in Biobetrieben eine Erregerausbreitung zwischen den Tieren und reduziert sozialen Stress, der als infektionsbegünstigender Faktor gilt (Prange, 2004).

Einfluss des Gesundheitsstatus auf die Nachweisraten schwach hämolysierender Brachyspiren

Trotz der zufälligen Auswahl, der in die vorliegende Studie einbezogenen Schweinebestände, wies eine ausreichende Anzahl von Herden zum Zeitpunkt der Probenentnahme Tiere mit Anzeichen von Durchfall auf, was eine Auswertung im Hinblick auf diese Symptomatik ermöglichte. Interessanterweise waren schwach hämolysierende Brachyspiren nicht nur in Sammelkotproben von Tieren mit Durchfall häufiger präsent, sondern auch häufiger bei Betrieben nachweisbar, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme durchfallkranke Tiere vorwiesen.

Betrachtet man die einzelnen Spezies getrennt voneinander, so trifft dies auf *B. pilosicoli*, *B. intermedia* und *B. innocens* zu. Vor allem bei *B. pilosicoli*, dem Erreger der porcinen wie auch der humanen intestinalen Spirochätose, war ein signifikanter Zusammenhang zwischen Klinik und Infektion auffallend und statistisch signifikant. Dies deckt sich mit den Daten in der Literatur (Jacobson et al., 2003; Møller et al., 1998). Die hier ermittelte Prävalenz für *B. pilosicoli* in den **Sammelkotproben** von Tieren mit Durchfall lag über den Werten, die in der Literatur für Deutschland angegeben wurden und auch über den meisten Prävalenzangaben, die im Ausland beschrieben sind. Über die Ursachen dieser Unterschiede wurde bereits an anderer Stelle dieser Diskussion eingegangen (siehe oben). Beim Vergleich der Prävalenzen, die jeweils auf der Basis gleicher diagnostischer Ansätze gewonnen wurden, sind in der hier vorliegenden Arbeit stets höhere Prävalenzen erzielt worden. Dies trifft mit Ausnahme der Studien von Biksi et al. (2007) und Jacobson et al. (2005), ebenso beim Vergleich von Vorkommenshäufigkeiten zu, die völlig unabhängig von den gewählten

diagnostischen Verfahren ausgewählt wurden. Somit dürften die Unterschiede aller Wahrscheinlichkeit auf der ausreichend hohen Anzahl an Stichproben in dieser Studie beruhen.

Im Hinblick auf die Diarrhoe war die ermittelte **Herdenprävalenz** für *B. pilosicoli* mit 24,5 % nicht allzu sehr verschieden zu der einzig vergleichbaren in Deutschland publizierten Studie von Reiner et al. (2011a) (31,6 %). Die sich teilweise erheblich unterscheidenden Studien zu diesem Thema im europäischen Ausland (Biksi et al., 2007; Carvajal et al., 2006) basieren auf mitunter sehr unterschiedlichen diagnostischen Verfahren und sind daher zum Vergleich nur schwer heran zu ziehen.

Der Vergleich der ermittelten Erregerprävalenzen im Hinblick auf den Befund „Diarrhoe“ zeigte auch bei *B. intermedia* eine signifikante Korrelation zwischen Erregernachweis und dem Symptom. Im Gegensatz hierzu war *B. murdochii* bei nicht an Durchfall leidenden Tieren häufiger nachweisbar. Diese Befunde deuten auf das Vorliegen einer pathogenen Eigenschaft von *B. intermedia* jedoch nicht von *B. murdochii* und *B. innocens* hin. Eine entsprechende Beurteilung der Pathogenität dieser Spezies wurde auch von Stanton (2006) auf Basis der Analyse von experimentellen Untersuchungen mit Huhn und Schwein als Modell vorgenommen. Im Hinblick auf die Pathogenität von *B. murdochii* liegen aus der Literatur kontroverse Auffassungen vor. Zwar wiesen Studien eine negative Korrelation zwischen dem Nachweis von *B. murdochii* und *B. innocens* und dem Vorliegen von Durchfall nach (Jacobson et al., 2005; Lim et al., 2012), andere Untersucher wiederum isolierten *B. murdochii* am häufigsten von durchfallkranken Schweinen (Osorio et al., 2013). Letzteres ist erklärlich da auch experimentelle Infektionen mit *B. murdochii*-Isolaten mitunter zu Kolitis und zu Änderungen in der Kotkonsistenz beim Schwein führten (Jensen et al., 2010). Schlussfolgernd müsste *B. murdochii* prinzipiell ebenfalls als pathogene Spezies bezeichnet werden. Demnach existieren beim Schwein drei pathogene schwach hämolysierende *B. spp.* Von Seiten ihrer Virulenz besitzen die zugehörigen Stämme jedoch erhebliche Unterschiede. Kursierende *B. pilosicoli*-Stämme können aller Wahrscheinlichkeit nach als virulent und die *B. intermedia*-Stämme als mäßig virulent bezeichnet werden. Was die *B. murdochii*-Stämme anbetrifft, dürfte die Beurteilung im Hinblick auf die Virulenz „äußerst gering“ lauten.

In der vorliegenden Arbeit blieb die Frage nach der Quantität der detektierten Brachyspiren in den Kotproben unberücksichtigt. Es könnte zwischen der Menge schwach hämolysierender Brachyspiren ein Zusammenhang zu klinischen Erscheinungen bzw. einer Colitis bestehen (Jensen et al., 2010; Komarek et al., 2009; Weissenböck et al., 2005). Reiner et al. (2011a) konnte nachweisen, dass es eine signifikant höhere Prävalenz von *B. hyodysenteriae* in Betrieben gab, in denen Tiere mit starkem Durchfall vorkamen, im Vergleich zu jenen mit Tieren ohne oder nur mit mildem Durchfall. Ähnliche Tendenzen konnten auch für *B. pilosicoli* nachgewiesen werden. Zudem hatten Betriebe mit schwerem Durchfall auch einen signifikant höheren Gehalt an *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* (Reiner et al., 2011a).

Es wäre daher mit Blick auf zukünftige Untersuchungen anzuregen, Proben nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ (z.B. realtime PCR) zu untersuchen, was für die Interpretation von Befunden hilfreich wäre (Jensen, 2009; Jensen et al., 2010).

Differentialdiagnostisch-mikrobiologische Untersuchungen bei Vorliegen einer Diarrhoe

Über den Nachweis von schwach hämolysierenden Brachyspiren hinausgehende Untersuchungen erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur bei Probenmaterialien, die von durchfallkranken Tieren entnommen wurden. Mit diesen, gezielt nur auf bestimmte Proben beschränkte, Untersuchungen sollten gegebenenfalls Erreger ausgeschlossen bzw. diagnostiziert werden, von denen ein ätiologisch gesicherter Zusammenhang zur Diarrhoe bekannt ist, um im Falle Brachyspiren positiver Proben eine sichere Beurteilungsgrundlage zu besitzen. Dies hat jedoch nur eine begrenzte Aussagekraft, da entsprechende Untersuchungen bei Tieren ohne Durchfall nicht durchgeführt wurden. Dennoch wurden die Ergebnisse in die vorliegende Arbeit aufgenommen, um zumindest einen Einblick über die Komplexität bei der Beurteilung der Bedeutung von schwach hämolysierenden Brachyspiren zu erhalten. In der überwiegenden Mehrheit der Betriebe (69,6 %) wurden weitere Durchfallerreger wie *B. hyodysenteriae*, *Salmonella* spp., *L. intracellularis* oder virulente *E. coli* Pathovare diagnostiziert. Entgegen Berichten anderer Untersucher (Stegel et al., 2000; Waldmann et al., 2000) wurden diese ausschließlich im Zusammenhang mit schwach hämolysierenden Brachyspiren nachgewiesen. In Übereinstimmung mit der Literatur (Williams, 2011) waren in etwa einem Drittel der Bestände (30,6 %), die Tiere mit Durchfall aufwiesen, keine weiteren bakteriellen Durchfallerreger nachweisbar. In zwei dieser Fälle konnte *B. pilosicoli* nachgewiesen werden, welcher somit als alleiniger Durchfallerreger in Frage kommen kann. Dies unterstreicht die Bedeutung von *B. pilosicoli* als Pathogen für Schweine.

Schlussfolgerungen

- Ein Kombinationsverfahren aus PCR und bakteriologischer Untersuchung wird zur Beschreibung der tatsächlichen Prävalenz von schwach hämolysierende Brachyspiren beim Schwein als besonders geeignet erachtet.
- Die unerwartet hohe Prävalenz von *B. murdochii*, *B. innocens* und *B. intermedia* im Vergleich zu der von *B. pilosicoli* scheint dennoch auf Grund des Untersuchungsansatzes (zufällige Auswahl einer statistisch repräsentativen Anzahl von Proben) die wahre epidemiologische Situation zu repräsentieren.
- Statistisch gesicherte Prävalenzunterschiede von *B. pilosicoli* im Hinblick auf das Vorliegen bzw. Fehlen von Diarrhoe bestätigen die Bedeutung dieses Erregers als Darnpatho-

gen. Geringere bzw. gar keine klinische Bedeutung ist nach diesen Auswertungen *B. intermedia* bzw. *B. murdochii* und *B. innocens* beizumessen.

6 Zusammenfassung

Innerhalb der Familie der *Brachyspiraceae* ist *B. hyodysenteriae* der wichtigste Krankheitserreger bei Schweinen. Schwach hämolysierende Spezies dieser Familie sind entweder nicht pathogen (*B. innocens*), führen zu Kolitis (*B. pilosicoli*) oder wurden gelegentlich aus Formen milderer Diarrhoe isoliert (*B. intermedia*, *B. murdochii*). Betrachtet man den deutschen Schweinemarkt, so wurde über ihr Auftreten lediglich anhand der Untersuchungen von diagnostischen Probenmaterialien berichtet. Somit muss davon ausgegangen werden, dass diese Ergebnisse nicht die wahre epidemiologische Situation widerspiegeln. Um Daten zur Prävalenz schwach hämolysierender Brachyspiren zu erhalten, wurde die hier vorliegende Studie so gestaltet, dass sie statistischen Ansprüchen genügt und sich mit hoher Genauigkeit für die Detektion von *Brachyspira* spp. in Kot eignet.

Die untersuchten Kotproben in der vorliegenden Studie stammten aus 165 randomisiert ausgewählten Mastbetrieben (mindestens 50 Schweine/Betrieb) in Nordhessen. Der Zeitraum der Untersuchung erstreckte sich von Juli 2011 bis Juni 2012. Abhängig von der Betriebsgröße wurden zwischen einer und vier Sammelkotproben pro Betrieb entnommen, alles in allem wurden 525 Sammelkotproben in der Studie eingeschlossen. Eine Sammelkotprobe bestand aus vier Einzelproben von Schweinen einer Bucht.

Hinsichtlich der gewählten Methoden der Brachyspirendiagnostik in Kotproben wurde bei dieser Studie eine duale Strategie verfolgt. Um die Nachweisrate zu erhöhen wurden sowohl eine kulturelle Anzucht der Brachyspiren, als auch die Anwendung von vier Monoplex-PCRs zum Nachweis der Bakterien in Kot-DNS-Extrakten angewendet. Monoplex-PCRs wurden eingesetzt, um schwach hämolysierende Brachyspiren direkt aus extrahierter DNS aus Kotproben zu detektieren. Für die Speziesdifferenzierung der angezüchteten schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. wurden verschiedene Duplex-PCR nach bestehenden Protokollen angewendet. Für die kulturelle Anzucht wurden die Sammelkotproben auf 5 %-igem Schafsblut Tryptikase-Soja-Agar ausgestrichen. Nach anaerober Inkubation von maximal 10 Tagen, wurden die verdächtigen Hämolysezonen mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Brachyspiren untersucht. Die Reinkulturen wurden abgeschwemmt und, um ihre Lebensfähigkeit zu erhalten, bei -70 °C sowie, um sie als Template in die PCRs einzusetzen, bei -20 °C gelagert. Eine statistische Auswertung wurde mittels Chi²-Test durchgeführt.

Von 165 Mastbetrieben in Nordhessen konnten bei nahezu allen, außer bei sieben Beständen, schwach hämolysierende Brachyspiren nachgewiesen werden. Der Anteil positiver Betriebe reichte von ca. 86 % und 79 % im Fall von *B. murdochii* und *B. innocens*, bis 58 % bei *B. intermedia* und 11 % bei *B. pilosicoli*. Dies war unerwartet, da vorange-

gangene Studien über niedrigere Prävalenzraten berichteten. Generell beeinflussen vor allem die Probenherkunft und die angewendeten diagnostischen Methoden die Ergebnisse. Da eine randomisierte, statistisch repräsentative Anzahl von Proben entnommen und eine sehr sensitive Diagnostik angewendet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Prävalenzraten dieser Studien sehr stark der wahren Situation annähern.

Bewertet man die klinische Bedeutung von schwach hämolysierenden *Brachyspiren*, so fällt auf, dass die Prävalenz bei Betrieben, in denen Tiere an Durchfall litten, verglichen mit solchen ohne Durchfall, nur geringfügig höher für *B. intermedia* (16 %-ige Zunahme) bzw. für *B. innocens* (9 %-ige Zunahme) war. Bei *B. murdochii* war es sogar eine 6 %-ige Abnahme. Im Gegensatz dazu, konnte *B. pilosicoli* fünfmal häufiger aus Betrieben mit durchfallkranken Schweinen als von Betrieben ohne diese Problematik isoliert werden, was seine Rolle als Krankheitserreger bestätigt. Die Ergebnisse für *B. murdochii* und *B. innocens* deuten höchstwahrscheinlich auf eine geringe Rolle dieser Erreger bei Durchfallgeschehen hin. *B. intermedia* spielt dagegen vermutlich eine intermediäre Rolle, da sowohl die Prävalenz ebenso wie die mögliche Assoziation zu Durchfallgeschehen zwischen der von *B. pilosicoli* auf der einen Seite und *B. innocens*/*B. murdochii* auf der anderen Seite einzuordnen sind.

Summary

Among the family *Brachyspiraceae* the strongly hemolytic *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae* is a major pathogen in pigs. Weakly hemolytic species of this family are either non-pathogenic (*B. innocens*), induce colitis (*B. pilosicoli*) or are occasionally isolated from milder forms of diarrhoea (*B. intermedia*, *B. murdochii*). Regarding the German pig industry, the occurrence of these species was reported only by examining diagnostic samples. The results obtained from those studies, however, were not believed to reflect the true epidemiological situation. To get reliable data on the prevalence of weakly hemolytic *Brachyspira* this study was designed in a way that will meet statistical requirements and that will be suited to detect *Brachyspira* spp. in feces with high accuracy.

Fecal swabs examined in the present study were taken from 165 randomly selected fattening pig herds (at least 50 pigs/herd) located in Northern Hesse. Time of sampling was from July 2011 to June 2012. Depending on the herd size 1 to 4 pooled fecal samples were taken from each farm resulting in a total of 525 pooled samples included in the present study. A pooled fecal sample consisted of four single samples of piglets belonging to one group held together in one pen.

Regarding the methods used to detect *Brachyspira* in fecal samples this study followed a dual strategy. Both methods, cultivation of *Brachyspira* as well as PCR using fecal DNA extracts, were applied in order to increase the detection rate. Four monoplex PCRs were used to detect weakly hemolytic *Brachyspira* spp. directly in DNA prepared from fecal swabs. For species characterization of cultivated weakly hemolytic *Brachyspira* spp. two duplex PCRs were conducted. For cultivation pooled fecal swab were streaked on tryptic soy agar containing 5 % sheep blood. After anaerobic incubation for a maximum of 10 days dark field microscopy was used to check suspicious hemolytic zones for the presence of spirochetes. Pure cultures were harvested and frozen at -70 °C to maintain the viability of the isolates and at -20 °C to be used as template for PCR. A statistical evaluation was performed by use of the Chi²-test.

Of a total of 165 fattening pigs farms in Northern Hesse animals shedding weakly hemolytic *Brachyspira* were detected in nearly all but seven farms. Rates of positive farms reached 86 % and 79 % in case of *B. murdochii* and *B. innocens*, 58 % in regard of *B. intermedia* and 11 % for *B. pilosicoli*. This was rather unexpected since former studies have reported lower prevalence rates. In general the source of samples and the applied diagnostic methods mainly influence results. Since by randomly selection a statistically representative number of

samples was taken and a highly sensitive diagnostic approach was used, the prevalence rates of this study are believed to reflect the almost true situation in the field.

Regarding the clinical importance of weakly hemolytic *Brachyspira* the rates of herds with pigs suffering from diarrhea compared to those devoid of diarrhea were only slightly higher when *B. intermedia* (16 % increase) or *B. innocens* (9 % increase) were detected. In case of *B. murdochii* there was even a 6 % decrease. In contrast, *B. pilosicoli* was five times as much detected in samples from pigs suffering from diarrhea than in samples from healthy pigs thus confirming its role as gut pathogen. For *B. murdochii* and *B. innocens*, however, the results are very likely suggestive for a low pathogenic role of these agents. *B. intermedia* might play an intermediate role since its distribution as well as its possible association with diarrhea is between those of *B. pilosicoli* on the one hand and *B. innocens*/*B. murdochii* on the other hand.

7 Literaturverzeichnis

- Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Combs, B.G., Hampson, D.J., 1998. Development and evaluation of polymerase chain reaction tests as an aid to diagnosis of swine dysentery and intestinal spirochaetosis. *Letters in applied microbiology*, 26(2): 126-130.
- Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 1996. Pulsed-field gel electrophoresis for sub-specific differentiation of *Serpulina pilosicoli* (formerly '*Anguillina coli*'). *FEMS Microbiol Lett*, 141(1): 77-81.
- Atyeo, R.F., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Suriyaarachichi, D.S., Hampson, D.J., 1999. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. *Vet Microbiol*, 67(1): 47-60.
- Backhans, A., Jansson, D.S., Aspan, A., Fellstrom, C., 2011. Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Vet Microbiol*, 153(1-2): 156-162.
- Backhans, A., Johansson, K.E., Fellström, C., 2010. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from wild rodents. *Environ Microbiol Reports*, 2(6): 720-727.
- Bait-Merabet, L., Thille, A., Legrand, P., Brun-Buisson, C., Cattoir, V., 2008. *Brachyspira pilosicoli* bloodstream infections: case report and review of the literature. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 7: 19.
- Bano, L., Merialdi, G., Bonilauri, P., Dall'Anese, G., Capello, K., Comin, D., Cattoli, G., Sanguinetti, V., Hampson, D.J., Agnoletti, F., 2008. Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathol*, 37(3): 281-286.
- Barcellos, D.E., de Uzeda, M., Ikuta, N., Lunge, V.R., Fonseca, A.S., Kader, I.I., Duhamel, G.E., 2000a. Identification of porcine intestinal spirochetes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. *Vet Microbiol*, 75(2): 189-198.
- Barcellos, D.E., Mathiesen, M.R., de Uzeda, M., Kader, I.I., Duhamel, G.E., 2000b. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. *Vet Rec*, 146(14): 398-403.
- Barth, S., Tscholshiew A., Menge C., W.R., Baljer G, Bauerfeind, R., 2007. Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 120: 307-316.
- Biksi, I., Lorincz, M., Molnar, B., Kecskes, T., Takacs, N., Mirt, D., Cizek, A., Pejsak, Z., Martineau, G.P., Sevin, J.L., Szenci, O., 2007. Prevalence of selected

- enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. *Acta Vet Hung*, 55(2): 219-227.
- Bisping, W., Amtsberg, G., 1988. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.
- Boye, M., Jensen, T.K., Moller, K., Leser, T.D., Jorsal, S.E., 1998. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. *Mol Cell Probes*, 12(5): 323-330.
- Bundesinstitut für Risikobewertung, 2009. Grundlagenstudie zum Vorkommen von *Salmonella* spp. in Zuchtschweinebeständen (Stellungnahme Nr. 049/2009 des BfR vom 25. März 2009). Abruf der Seite am: 01.12.2014.
http://www.bfr.bund.de/cm/343/grundlagenstudie_zum_vorkommen_von_salmonella_spp_in_zuchtschweinebestaenden_vorgelegt.pdf.
- Burrough, E., Strait, E., Kinyon, J., Bower, L., Madson, D., Schwartz, K., Frana, T., Songer, J.G., 2012a. Comparison of atypical *Brachyspira* spp. clinical isolates and classic strains in a mouse model of swine dysentery. *Vet Microbiol*, 160(3-4): 387-394.
- Burrough, E.R., Strait, E.L., Kinyon, J.M., Bower, L.P., Madson, D.M., Wilberts, B.L., Schwartz, K.J., Frana, T.S., Songer, J.G., 2012b. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest*, 24(6): 1025-1034.
- Burrough, E.R., Wilberts, B.L., Bower, L.P., Jergens, A.E., Schwartz, K.J., 2013. Fluorescent *in situ* hybridization for detection of "*Brachyspira hampsonii*" in porcine colonic tissues. *J Vet Diagn Invest*, 25(3): 407-412.
- Busch, W., Methling, W., Amselgruber, W.M., 2004. Tiergesundheit- und Tierkrankheitslehre. Parey Verlag, Stuttgart, Germany.
- Calderaro, A., Bommezzadri, S., Piccolo, G., Zuelli, C., Dettori, G., Chezzi, C., 2005. Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. *Vet Microbiol*, 105(3-4): 229-234.
- Calderaro, A., Piccolo, G., Montecchini, S., Buttrini, M., Gorrini, C., Rossi, S., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Medici, M.C., Chezzi, C., 2013. MALDI-TOF MS analysis of human and animal *Brachyspira* species and benefits of database extension. *J Proteomics*, 78: 273-280.
- Carvajal, A., de Arriba, M.L., Rodriguez, H., Vidal, A.B., Duhamel, G.E., Rubio, P., 2006. Prevalence of *Brachyspira* species in pigs with diarrhoea in Spain. *Vet Rec*, 158(20): 700-701.
- Chander, Y., Primus, A., Oliveira, S., Gebhart, C.J., 2012. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hampsonii*". *J Vet Diagn Invest*, 24(5): 903-910.
- Choi, C., Han, D.U., Kim, J., Cho, W.S., Chung, H.K., Jung, T., Yoon, B.S., Chae, C., 2002. Prevalence of *Brachyspira pilosicoli* in Korean pigs, determined using a nested PCR. *Vet Rec*, 150(7): 217-218.

- Clothier, K.A., Kinyon, J.M., Frana, T.S., Naberhaus, N., Bower, L., Strait, E.L., Schwartz, K., 2011. Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *J Vet Diagn Invest*, 23(6): 1140-1145.
- Combs, B.G., Hampson, D.J., Harders, S.J., 1992. Typing of Australian isolates of *Treponema hyodysenteriae* by serology and by DNA restriction endonuclease analysis. *Vet Microbiol*, 31(2-3): 273-285.
- Corona-Barrera, E., Smith, D.G., La, T., Hampson, D.J., Thomson, J.R., 2004. Immunomagnetic separation of the intestinal spirochaetes *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira hyodysenteriae* from porcine faeces. *J Med Microbiol*, 53(Pt 4): 301-307.
- De Arriba, M.L., Vidal, A.B., Carvajal, A., Pozo, J., Martinez, A., Duhamel, G.E., Rubio, P., 2002. First confirmation of porcine colonic spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in Iberian pigs in Spain. *Vet Rec*, 150(8): 250-251.
- De Smet, K.A., Worth, D.E., Barrett, S.P., 1998. Variation amongst human isolates of *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* based on biochemical characterization and 16S rRNA gene sequencing. *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 4: 1257-1263.
- Duhamel, G.E., Elder, R.O., Muniappa, N., Mathiesen, M.R., Wong, V.J., Tarara, R.P., 1997. Colonic spirochetel infections in nonhuman primates that were associated with *Brachyspira aalborgi*, *Serpulina pilosicoli*, and unclassified flagellated bacteria. *Clin Infect Dis*, 25(Suppl 2): S186-188.
- Duhamel, G.E., Trott, D.J., Muniappa, N., Mathiesen, M.R., Tarasiuk, K., Lee, J.I., Hampson, D.J., 1998. Canine intestinal spirochetes consist of *Serpulina pilosicoli* and a newly identified group provisionally designated "*Serpulina canis*" sp. nov. *J Clin Microbiol*, 36(8): 2264-2270.
- Dwars, R.M., Davelaar, F.G., Smit, H.F., 1992. Spirochaetosis in broilers. *Avian Pathol*, 21(2): 261-273.
- Feberwee, A., Hampson, D.J., Phillips, N.D., La, T., van der Heijden, H.M., Wellenberg, G.J., Dwars, R.M., Landman, W.J., 2008. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* and other pathogenic *Brachyspira* species in chickens from laying flocks with diarrhea or reduced production or both. *J Clin Microbiol*, 46(2): 593-600.
- Fellstrom, C., Gunnarsson, A., 1995. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res Vet Sci*, 59(1): 1-4.
- Fellstrom, C., Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., Aspan, A., 1999. Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Vet Microbiol*, 70(3-4): 225-238.
- Fellström, C., Melin, L., Wierup, M., Gunnarsson, A. 1998. Isolation of *Serpulina* species in Swedish pig herds with diarrhoea. In: Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, UK.

- Fellstrom, C., Pettersson, B., Johansson, K.E., Lundeheim, N., Gunnarsson, A., 1996. Prevalence of *Serpulina* species in relation to diarrhea and feed medication in pig-rearing herds in Sweden. *Am J Vet Res*, 57(6): 807-811.
- Fellstrom, C., Pettersson, B., Thomson, J., Gunnarsson, A., Persson, M., Johansson, K.E., 1997. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *J Clin Microbiol*, 35(2): 462-467.
- Fellstrom, C., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., Feinstein, R., 2001a. Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs. *Anim Health Res Rev*, 2(1): 75-82.
- Fellstrom, C., Rasback, T., Johansson, K.E., Olofsson, T., Aspan, A., 2008. Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. *J Microbiol Methods*, 72(2): 133-140.
- Fellstrom, C., Zimmerman, U., Aspan, A., Gunnarsson, A., 2001b. The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev*, 2(1): 37-43.
- Feltrup, C., Verspohl, J., Amtsberg, G., 1999. Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochatendiarrhoe. 1. Mitteilung: Kulturell-biochemische Differenzierung intestinaler Serpulinen in der Routinediagnostik. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 106(5): 200-207.
- Fisher, L.N., Mathiesen, M.R., Duhamel, G.E., 1997. Restriction fragment length polymorphism of the periplasmic flagellar *flaA1* gene of *Serpulina* species. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4(6): 681-686.
- Fossi, M., Pohjanvirta, T., Sukura, A., Heinikainen, S., Lindecrone, R., Pelkonen, S., 2004. Molecular and ultrastructural characterization of porcine hippurate-negative *Brachyspira pilosicoli*. *J Clin Microbiol*, 42(7): 3153-3158.
- Girard, C., Lemarchand, T., Higgins, R., 1995. Porcine colonic spirochetosis: a retrospective study of eleven cases. *Can Vet J*, 36(5): 291-294.
- Hampson, D.J., Duhamel, G.E. 2006. Porcine colonic spirochetosis/Intestinal spirochetosis. In: B.E., S., J.J., Z., S., D.A., D.J., T. (Eds.) *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing Ltd, Ames, Iowa, 755-767.
- Hampson, D.J., La, T., 2006. Reclassification of *Serpulina intermedia* and *Serpulina murdochii* in the genus *Brachyspira* as *Brachyspira intermedia* comb. nov. and *Brachyspira murdochii* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(Pt 5): 1009-1012.
- Hampson, D.J., Lester, G.D., Phillips, N.D., La, T., 2006a. Isolation of *Brachyspira pilosicoli* from weanling horses with chronic diarrhoea. *Vet Rec*, 158(19): 661-662.
- Hampson, D.J., Oxberry, S.L., La, T., 2006b. Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. *Emerg Infect Dis*, 12(5): 869-870.
- Hampson, D.J., Swayne, D.E. 2006. Avian intestinal spirochetosis. In: Saif, Y.M. (Ed.) *Diseases of Poultry*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom.

- Hampson, D.J. 2012. Brachyspiral Colitis. In: Zimmermann, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J. (Eds.) Diseases of Swine. John Wiley & Sons, Ltd. , West Sussex, United Kingdom, 680-696.
- Harel, J., Belanger, M., Forget, C., Jacques, M., 1994. Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 from Quebec by restriction endonuclease fingerprinting and ribotyping. Can J Vet Res, 58(4): 302-305.
- Heinonen, M., Fossi, M., Jalli, J.P., Saloniemi, H., Tuovinen, V., 2000. Detectability and prevalence of *Brachyspira* species in herds rearing health class feeder pigs in Finland. Vet Rec, 146(12): 343-347.
- Herbst, W., Willems, H., Baljer, G., 2004. Verbreitung von *Brachyspira hyodysenteriae* und *Lawsonia intracellularis* bei gesunden und durchfallkranken Schweinen. Berl Münch Tierärztl Wochenschr, 117: 493-498.
- Herzog, A.M., Maderner, A., Fragner, K., Weissenböck, H., 2005. Einsatz der *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von *Brachyspira* spp. beim Schwein. Dtsch Tierärztl Wochenschr, 112(4): 123-129.
- Hommez, J., Castryck, F., Haesebrouck, F., Devriese, L.A., 1998. Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. Vet Microbiol, 62(2): 163-169.
- Jacobson, M., Gerth Lofstedt, M., Holmgren, N., Lundeheim, N., Fellstrom, C., 2005. The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 52(9): 386-391.
- Jacobson, M., Hard af Segerstad, C., Gunnarsson, A., Fellstrom, C., de Verdier Klingenberg, K., Wallgren, P., Jensen-Waern, M., 2003. Diarrhoea in the growing pig - a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. Res Vet Sci, 74(2): 163-169.
- Jamshidian, M., La, T., Phillips, N.D., Hampson, D.J., 2003. *Brachyspira pilosicoli* colonization in experimentally infected mice can be facilitated by dietary manipulation. J Med Microbiol, 53: 313-318.
- Jensen, T.K. 2009. Pathology of enteritis in pigs. In: Proceedings of the 1st European Symposium of Porcine Health, Copenhagen, Denmark.
- Jensen, T.K., Boye, M. 2005. Application of immunohistochemistry and fluorescent *in situ* hybridization for the detection of the porcine large intestinal agents *Lawsonia intracellularis*, Porcine Circovirus type 2, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira innocens*, *Brachyspira murdochii* and *Brachyspira intermedia*. In: Proceedings of the 3rd International Conference on Colonic Infections in Animal and Human, Parma, Italy.
- Jensen, T.K., Boye, M. 2006. Pathology of naturally acquired colonic *Brachyspira murdochii* infection in pigs studied by fluorescent *in situ* hybridisation. In: Proceedings of the 19th International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, Denmark.

- Jensen, T.K., Boye, M., Moller, K., 2004. Extensive intestinal spirochaetosis in pigs challenged with *Brachyspira pilosicoli*. J Med Microbiol, 53(Pt 4): 309-312.
- Jensen, T.K., Christensen, A.S., Boye, M., 2010. *Brachyspira murdochii* colitis in pigs. Vet Pathol, 47(2): 334-338.
- Jensen, T.K., Moller, K., Boye, M., Leser, T.D., Jorsal, S.E., 2000. Scanning electron microscopy and fluorescent in situ hybridization of experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* infection in growing pigs. Vet Pathol, 37(1): 22-32.
- Kanavaki, S., Mantadakis, E., Thomakos, N., Pefanis, A., Matsiota-Bernard, P., Karabela, S., Samonis, G., 2002. *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* spirochetemia in an immunocompromised patient. Infection, 30(3): 175-177.
- Kärber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Pathol Pharmacol, 162: 480-483.
- Kasbohrer, A., Gelderblom, H.R., Arasteh, K., Heise, W., Grosse, G., L'Age, M., Schonberg, A., Koch, M.A., Pauli, G., 1990. Intestinale Spirochätose bei HIV-Infektion. Vorkommen, Isolierung und Morphologie der Spirochäten. Dtsch Med Wochenschr, 115(40): 1499-1506.
- Kim, T.J., Lee, J.I., 2006. The 23S rRNA gene PCR-RFLP used for characterization of porcine intestinal spirochete isolates. J Vet Sci, 7(3): 277-280.
- Komarek, V., Maderner, A., Spargser, J., Weissenböck, H., 2009. Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. Vet Microbiol, 134(3-4): 311-317.
- Kunkle, R.A., Kinyon, J.M., 1988. Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J Clin Microbiol, 26(11): 2357-2360.
- La, T., Collins, A.M., Phillips, N.D., Oksa, A., Hampson, D.J., 2006. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. Letters in applied microbiology, 42(3): 284-288.
- La, T., Phillips, N.D., Hampson, D.J., 2003. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J Clin Microbiol, 41(7): 3372-3375.
- La, T., Phillips, N.D., Harland, B.L., Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., Hampson, D.J., 2009. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet Microbiol, 138(3-4): 330-338.
- Law, C.L., Grierson, J.M., Stevens, S.M., 1994. Rectal spirochaetosis in homosexual men: the association with sexual practices, HIV infection and enteric flora. Genitourin Med, 70(1): 26-29.
- Lee, J.I., Hampson, D.J., 1994. Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. J Med Microbiol, 40(5): 365-371.

- Lee, J.I., Hampson, D.J., Lymbery, A.J., Harders, S.J., 1993. The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. *Vet Microbiol*, 34(3): 273-285.
- Leser, T.D., Moller, K., Jensen, T.K., Jorsal, S.E., 1997. Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. *Mol Cell Probes*, 11(5): 363-372.
- Lim, S., Lee, H., Nam, H., Cho, Y., Jung, S., Joo, Y., 2012. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Brachyspira* species in pigs in Korea. *Korean J Vet Res*, 52(4): 253-257.
- Manabe, M., Suenaga, I., Ogawa, Y., Adachi, Y., 2004. *Brachyspira pilosicoli* isolated from two beagles and one mongrel in Japan. *J Vet Med Sci*, 66(5): 589-592.
- Marshall, T., Allen, A., 1978. The isolation and characterization of the high-molecular-weight glycoprotein from pig colonic mucus. *Biochem J*, 173(2): 569-578.
- McLaren, A.J., Trott, D.J., Swayne, D.E., Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 1997. Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J Clin Microbiol*, 35(2): 412-417.
- Meriäldi, G., Bonilauri, P., Granelli, F., Luppi, A., Dottori, M., 2003. Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy. *Vet Rec*, 153(17): 529-530.
- Mikosza, A.S., La, T., Brooke, C.J., Lindboe, C.F., Ward, P.B., Heine, R.G., Guccion, J.G., de Boer, W.B., Hampson, D.J., 1999. PCR amplification from fixed tissue indicates frequent involvement of *Brachyspira aalborgi* in human intestinal spirochetosis. *J Clin Microbiol*, 37(6): 2093-2098.
- Milner, J.A., Sellwood, R., 1994. Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect Immun*, 62(9): 4095-4099.
- Moller, K., Jensen, T.K., Jorsal, S.E., Leser, T.D., Carstensen, B., 1998. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet Microbiol*, 62(1): 59-72.
- Muniappa, N., Mathiesen, M.R., Duhamel, G.E., 1997. Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J Vet Diagn Invest*, 9(2): 165-171.
- Naresh, R., Hampson, D.J., 2010. Attraction of *Brachyspira pilosicoli* to mucin. *Microbiology*, 156(Pt 1): 191-197.
- Naresh, R., Song, Y., Hampson, D.J., 2009. The intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* attaches to cultured Caco-2 cells and induces pathological changes. *PLoS One*, 4(12): e8352.

- Nathues, H., Oliveira, C.J., Wurm, M., Grosse Beilage, E., Givisiez, P.E., 2007. Simultaneous detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces and tissue samples by multiplex-PCR. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 54(9): 532-538.
- Neef, N.A., Lysons, R.J., Trott, D.J., Hampson, D.J., Jones, P.W., Morgan, J.H., 1994. Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. Infect Immun, 62(6): 2395-2403.
- Nguyen Thi, T.L., 2007. Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenität von *Brachyspira innocens*, *Brachyspira murdochii* und *Brachyspira intermedia* im Vergleich zur *Brachyspira-hyodysenteriae*-Infektion. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Nietfeld, J.C. 2013. Spiral-Curved Organisms II: *Brachyspira* (*Serpulina*) and *Lawsonia*. In: McVey, D.S., Kennedy, M., Chengappa, M.M. (Eds.) Veterinary Microbiology. Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK, 158-166.
- Ohya, T., Araki, H., Sueyoshi, M., 2008. Identification of weakly beta-hemolytic porcine spirochetes by biochemical reactions, PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis and species-specific PCR. J Vet Med Sci, 70(8): 837-840.
- Osorio, J., Carcajal, A., Hidalgo, A., Argüello, H., Álvarez, S., Naharro, G., Rubio, P. 2010. Spirochaetes isolated from pigs in Spain. In: Proceedings of the 21st International Pig Veterinary Society Congress, Vancouver, Canada.
- Osorio, J., Carvajal, A., Naharro, G., Rubio, P., La, T., Phillips, N.D., Hampson, D.J., 2013. Identification of weakly haemolytic *Brachyspira* isolates recovered from pigs with diarrhoea in Spain and Portugal and comparison with results from other countries. Res Vet Sci, 95(3): 861-869.
- Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 2003. Colonisation of pet shop puppies with *Brachyspira pilosicoli*. Vet Microbiol, 93(2): 167-174.
- Palzer, A., Ritzmann, M., 2008. Enteritis bei Mastschweinen. Tierärztl Praxis, 4: 257-265.
- Park, N.Y., Chung, C.Y., McLaren, A.J., Atyeo, R.F., Hampson, D.J., 1995. Polymerase chain reaction for identification of human and porcine spirochaetes recovered from cases of intestinal spirochaetosis. FEMS Microbiol Lett, 125(2-3): 225-229.
- Phillips, N.D., La, T., Adams, P.J., Harland, B.L., Fenwick, S.G., Hampson, D.J., 2009. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. Vet Microbiol, 134(3-4): 294-299.
- Phillips, N.D., La, T., Amin, M.M., Hampson, D.J., 2010. *Brachyspira intermedia* strain diversity and relationships to the other indole-positive *Brachyspira* species. Vet Microbiol, 143(2-4): 246-254.
- Phillips, N.D., La, T., Hampson, D.J., 2006. Development of a two-step nested duplex PCR assay for the rapid detection of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* in chicken faeces. Vet Microbiol, 116(1-3): 239-245.

- Plawinska, J., Jakubowski, T., Rzewuska, M., Binek, M., 2004. Occurrence of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* spp. infection in swine suffering from diarrhoea. Pol J Vet Sci, 7(3): 203-206.
- Prange, H., 2004. Gesundheitsmanagement Schweinehaltung. Ulmer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Prim, N., Pericas, R., Espanol, M., Rivera, A., Mirelis, B., Coll, P., 2011. Bloodstream infection due to *Brachyspira pilosicoli* in a patient with multiorgan failure. J Clin Microbiol, 49(10): 3697-3699.
- Prohaska, S., Pfluger, V., Ziegler, D., Scherrer, S., Frei, D., Lehmann, A., Wittenbrink, M.M., Huber, H., 2014. MALDI-TOF MS for identification of porcine *Brachyspira* species. Letters in applied microbiology, 58(3): 292-298.
- Randall, L.P., Mappley, L., Lemma, F., Churchward, C., Ayling, R., Fielder, M., Whatmore, A., Coldham, N. 2011. Speciation of *Brachyspira*, *Brucella* and *Mycoplasma* species by MALDI-TOF. In: Proceedings of the 21st European Congress of Clinical Microbes and Infectious Diseases (ECCMID), Mailand, Italy.
- Rasbäck, T., Fellstrom, C., Bergsjö, B., Cizek, A., Collin, K., Gunnarsson, A., Jensen, S.M., Mars, A., Thomson, J., Vyt, P., Pringle, M., 2005. Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test. Vet Microbiol, 109(3-4): 229-243.
- Rasbäck, T., Fellstrom, C., Gunnarsson, A., Aspan, A., 2006. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. J Microbiol Methods, 66(2): 347-353.
- Rasbäck, T., Jansson, D.S., Johansson, K.E., Fellstrom, C., 2007a. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. Environ Microbiol, 9(4): 983-991.
- Rasbäck, T., Johansson, K.E., Jansson, D.S., Fellstrom, C., Alikhani, M.Y., La, T., Dunn, D.S., Hampson, D.J., 2007b. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. Microbiology, 153(Pt 12): 4074-4087.
- Rasbäck, T., Melin, L., Lundeheim, N., Gunnarsson, A., Fellström, C. 2004. Isolation of *Brachyspira* species in Swedish pig herds with diarrhoea 1996-2003. In: Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany.
- Reiner, G., Hillen, S., von Berg, S., Kixmoller, M., Willems, H., 2011a. Analysis of bacterial load and prevalence of mixed infections with *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and/or *Brachyspira pilosicoli* in German pigs with diarrhoea. Berl Münch Tierärztl Wochenschr, 124(5-6): 236-241.
- Reiner, G., Winkelmann, M., Willems, H., 2011b. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. Europ J Wildlife Res, 57(3): 443-448.

- Rohde, J., Habighorst-Blome, K., 2012. An up-date on the differentiation of *Brachyspira* species from pigs with *nox*-PCR-based restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol*, 158(1-2): 211-215.
- Rohde, J., Rothkamp, A., Gerlach, G.F., 2002. Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 40(7): 2598-2600.
- Rolle, M., Mayr, A., 2007. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart, Germany.
- Rothkamp, A., Rohde, J., Verspohl, J. 2005. *Brachyspira* species isolated from pig herds in Northern Germany in 2002-2004. In: Proceedings of the 3rd International Conference on Colonic Infections in Animal and Human, Parma, Italy.
- Sacco, R.E., Trampel, D.W., Wannemuehler, M.J., 1997. Experimental Infection of C3H mice with Avian, Porcine, or Human Isolates of *Serpulina pilosicoli*. *Infect Immun*, 65(12): 5349-5353.
- Schneider, S., 2014. Serologische Charakterisierung von *Brachyspira hyodysenteriae*-Feldisolaten aus dem In- und Ausland. Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Germany.
- Song, Y., Hampson, D.J., 2009. Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens. *Vet Microbiol*, 137(1-2): 129-136.
- Spearman, C., 1908. The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae. *Brit J Psychol*, 2: 227-242.
- Spearman, J.G., Nayar, G., Sheridan, M., 1988. Colitis associated with *Treponema innocens* in pigs. *Can Vet J*, 29.
- Stanton, T.B. 2006. The genus *Brachyspira* In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes*. Springer, New York, 330-356.
- Stanton, T.B., Fournie-Amazouz, E., Postic, D., Trott, D.J., Grimont, P.A., Baranton, G., Hampson, D.J., Saint Girons, I., 1997. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4): 1007-1012.
- Stanton, T.B., Trott, D.J., Lee, J.I., McLaren, A.J., Hampson, D.J., Paster, B.J., Jensen, N.S., 1996. Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons. *FEMS Microbiol Lett*, 136(2): 181-186.
- Stege, H., Jensen, T.K., Moller, K., Baekbo, P., Jorsal, S.E., 2000. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med*, 46: 279-292.
- Stege, H., Jensen, T.K., Moller, K., Baekbo, P., Jorsal, S.E., 2001. Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Prev Vet Med*, 50(1-2): 153-164.

- Stephens, C.P., Oxberry, S.L., Phillips, N.D., La, T., Hampson, D.J., 2005. The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) colonising hens in commercial flocks. *Vet Microbiol*, 107(1-2): 149-157.
- Suriyaarachchi, D.S., Mikosza, A.S., Atyeo, R.F., Hampson, D.J., 2000. Evaluation of a 23S rDNA polymerase chain reaction assay for identification of *Serpulina intermedia*, and strain typing using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol*, 71(1-2): 139-148.
- Tasu, C., Tanaka, T., Tanaka, T., Adachi, Y., 2004. *Brachyspira pilosicoli* isolated from pigs in Japan. *J Vet Med Sci*, 66(7): 875-877.
- Taylor, D.J., Alexander, T.J., 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br Vet J*, 127(11): 58-61.
- Taylor, D.J., Simmons, J.R., Laird, H.M., 1980. Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec*, 106(15): 326-332.
- Thomson, J.R., Murray, B.P., Henderson, L.E., Thacker, J., Burch, D.G.S. 2007. *Brachyspira* species isolated from UK poultry samples. In: Proceedings of the 4th International Conference on Colonic Infections in Animal and Human, Prague, Czech Republic.
- Thomson, J.R., Smith, W.J., Murray, B.P., 1998. Investigations into field cases of porcine colitis with particular reference to infection with *Serpulina pilosicoli*. *Vet Rec*, 142: 235-239.
- Thomson, J.R., Smith, W.J., Murray, B.P., McOrist, S., 1997. Pathogenicity of three strains of *Serpulina pilosicoli* in pigs with a naturally acquired intestinal flora. *Infect Immun*, 65(9): 3693-3700.
- Townsend, K.M., Giang, V.N., Stephens, C., Scott, P.T., Trott, D.J., 2005. Application of *nox*-restriction fragment length polymorphism for the differentiation of *Brachyspira* intestinal spirochetes isolated from pigs and poultry in Australia. *J Vet Diagn Invest*, 17(2): 103-109.
- Trampel, D.W., Jensen, N.S., Hoffman, L.J., 1994. Cecal spirochetosis in commercial laying hens. *Avian Dis*, 38(4): 895-898.
- Trivett-Moore, N.L., Gilbert, G.L., Law, C.L., Trott, D.J., Hampson, D.J., 1998. Isolation of *Serpulina pilosicoli* from rectal biopsy specimens showing evidence of intestinal spirochetosis. *J Clin Microbiol*, 36(1): 261-265.
- Trott, D.J., Atyeo, R.F., Lee, J.I., Swayne, D.A., Stoutenburg, J.W., Hampson, D.J., 1996a. Genetic relatedness amongst intestinal spirochaetes isolated from rats and birds. *Letters in applied microbiology*, 23(6): 431-436.
- Trott, D.J., Combs, B.G., Mikosza, A.S., Oxberry, S.L., Robertson, I.D., Passey, M., Taime, J., Sehuko, R., Alpers, M.P., Hampson, D.J., 1997. The prevalence of *Serpulina pilosicoli* in humans and domestic animals in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol Infect*, 119(3): 369-379.

- Trott, D.J., Huxtable, C.R., Hampson, D.J., 1996b. Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infect Immun*, 64(11): 4648-4654.
- Trott, D.J., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Duhamel, G.E., Johnson, J.L., Hampson, D.J., 1996c. *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Bacteriol*, 46(1): 206-215.
- Verspohl, J., Feltrup, J., Thiede, S., Amtsberg, G., 2001. Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochaetendiarrhoe. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 108(2): 41-80.
- Waldmann, K.-H., Wendt, M., 2004. Lehrbuch der Schweinekrankheiten 4th Edition. Parey Verlag, Berlin, Germany.
- Waldmann, K.H., Wendt, M., Amtsberg, G., 2000. Untersuchungen zur *Brachyspira*-Diagnostik und Behandlungsstrategie bei der Schweinedysenterie. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 107(12): 486-489.
- Weissenböck, H., Maderner, A., Herzog, A.M., Lussy, H., Nowotny, N., 2005. Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of *nox* using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Vet Microbiol*, 111(1-2): 67-75.
- Wendt, M., Nguyen Thi, T.L., Rothkamp, A., Seeliger, F., Baumgärtner, W. 2009. Pathogenicity study on *Brachyspira innocens*, *Brachyspira murdochii* and *Brachyspira intermedia* in comparison to a *Brachyspira hyodysenteriae* infection. In: Proceedings of the 5th International Conference on Colonic Infections in Animal and Human, Léon, Spain.
- Wendt, M., Schulze Johann, R., Verspohl, J., 2006. Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Lawsonia-intracellularis*-Infektionen in Schweinebeständen. *Tierärztl Praxis*, 34 (G) 230-239.
- Werner, C., Sundrum, A., Göbel, A., Eisenberg, T., Zschöck, M. 2011. Vergleich des Erregerspektrums bei an Durchfall erkrankten und klinisch gesunden Absetzferkeln auf ökologisch wirtschaftenden Ferkelerzeugerbetrieben. In: Tagungsband der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau Gießen, Germany.
- Willems, H., Reiner, G., 2010. A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 123(5-6): 205-209.
- Williams, K., 2011. Retrospektive Studie über das Keimspektrum bei Durchfallerkrankungen des Schweines. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Witters, N.A., Duhamel, G.E., 1999. Motility-regulated mucin association of *Serpulina pilosicoli*, the agent of colonic spirochetosis of humans and animals. *Adv Exp Med Biol*, 473: 199-205.
- Zehe, F., Zimmermann, W., Goy, N., Albini, S., Doherr, M.G., Scheer, P., Speiser, S.A. 2009. Occurrence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira*

pilosicoli and their factors in Switzerland. In: Proceedings of the 1st European Symposium of Porcine Health, Copenhagen, Denmark.

Zeeshan, M., Irfan, S., Ahmed, I., 2009. *Brachyspira* species blood stream infection. J Pak Med Assoc, 59(10): 723-724.

8 Anhang

Verwendete Puffer und Medien:

BHI-Medium

Fa. Merck, Darmstadt	37 g
A. dest.	ad 1000 ml

BHIF^{CVSSR}-Medium

Fa. Merck KGaA, Darmstadt	37 g
Colistin (62,25 mg in 125 ml A. dest.)	12,5 ml
Vancomycin (60 mg in 125 ml A. dest.)	12,5 ml
Spectinomycin (1000 mg in 125 ml A. dest.)	25 ml
Spiramycin (152,5 mg in 25 ml Äthanol und 100 ml A. dest.)	12,5 ml
Rifampicin (125 mg in 25 ml Äthanol und 100 ml A. dest.)	12,5 ml
A. dest.	ad 1000ml
FKS (Fötales Kälberserum) – immer frisch zugesetzt	20 %

Blutagar

Blut-Agar (Basis), Fa. Merck KGaA, Darmstadt	20 g
NaCl	5 g
Agar-Agar	15 g

Caso-Agar

Pepton aus Casein	15 g
Pepton aus Sojamehl	5 g
NaCl	5 g
Agar-Agar	15 g

ChromID Salmonella Agar, BioMérieux Cat ??

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

Tris	242 g
Eisessig	57,1 g
Na-EDTA x 2 H ₂ O (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml

Gassneragar

Fa. Oxoid GmbH, Wesel, Kat. Nr.: GF601B	77 g
A. dest.	ad 1000 ml

Ladepuffer

Bromphenolblau	12,5 mg
Xylencyanol FF	12,5 mg
Glycerin (30 %)	2,6 ml
A. dest.	7,4 ml

Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung

Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus	0,01 ml
6x Loading Dye solution (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth)	0,03 ml
A. dest.	0,12 ml

Lysispuffer (AVID X/1998)

Guanidinthiocyanat (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)	6 M
---	-----

EDTA (Fa. Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim)	22 mM
Tris HCl (Fa. Boehringer-Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim)	0,1 M
Triton X (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)	0,65 %

Tris-Puffer (1 M, ungepuffert)

Tris	121,14 g
A. dest.	ad 1000 ml

TSA^{CVSSR}-Agar (mit Schafblut)

Caso-Agar, Fa. Merck KGaA, Darmstadt	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
Colistin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	6,23 mg
Vancomycin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	6 mg
Spectinomycin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	200 mg
Spiramycin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	15,25 mg
Rifampicin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	12,5 mg
A. dest.	ad 1000ml

9 Abbildungsverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 1:	Vergleich der starken (A) und schwachen (B) Hämolyse bei <i>Brachyspiren</i> nach 5-tägiger Anzucht auf TSACVSSR-Agar bei 37 °C.	4
Abbildung 2:	Anzahl der in die Untersuchung einbezogenen Schweinemastbetriebe in den Landkreisen Nordhessens.	28
Abbildung 3:	Ablauf der Diagnostik von <i>Brachyspiren</i> in Kottupferproben von Schweinen.	30
Abbildung 4:	Elektropherogramm der Duplex-PCR A zur Identifikation von <i>B. pilosicoli</i> und <i>B. innocens</i>	40
Abbildung 5:	Elektropherogramm von Bakteriensuspensionen mit unterschiedlich hohen Konzentrationen von <i>B. pilosicoli</i> und <i>B. innocens</i> nach Duplex-PCR A.	42
Abbildung 6:	Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Untersuchungsverfahren zum Nachweis von schwach hämolysierenden <i>Brachyspiren</i> in Sammelkotproben.	44
Abbildung 7:	Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Untersuchungsverfahren zur Ermittlung von Beständen mit <i>Brachyspira</i> spp.-infizierten Tieren	47
Abbildung 8:	Verteilung der untersuchten Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-infizierten Tieren nach der Anzahl gehaltener Schweine	51

9.2 Tabellen

Tabelle 1	Differenzierung porciner <i>Brachyspiren</i> anhand kulturell-biochemischer Merkmale	5
Tabelle 2	Publizierte Primer zum PCR-Nachweis schwach hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp.	7
Tabelle 3	Publizierte PCR-RFLP-Analysen zur Identifikation von <i>Brachyspira</i> spp.	9
Tabelle 4	Berichte zum weltweiten Vorkommen schwach hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp. und differentialdiagnostisch bedeutsamer Pathogene bei Schweinen.	20
Tabelle 5	Verwendete <i>Brachyspira</i> sp.-Kontrollstämme.	27
Tabelle 6	Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Referenzstämme.	27
Tabelle 7	Reaktionsbedingungen und Kontrollen der verwendeten PCRs.	34
Tabelle 8	Bezeichnung und Lokalisation der verwendeten Primer im Genom.	35
Tabelle 9	Spezifität der Monoplex-PCRs zum Nachweis schwach hämolysierender <i>Brachyspiren</i> in Kotproben vom Schwein	39

Tabelle 10	Sensitivität der speziesspezifischen Monoplex-PCRs zum Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren in Kotproben vom Schwein40
Tabelle 11	Erforderliche Mindestkonzentrationen an Spirochäten im Template bei der Differenzierung von Brachyspiren mittels Duplex-PCRs A und B41
Tabelle 12	Nachweisraten schwach-hämolysierender Brachyspiren in Sammelkotproben mittels kultureller Untersuchung und PCR43
Tabelle 13	Einzel- und Mehrfach-Nachweise von schwach hämolysierenden Brachyspiren in Sammelkotproben.....45
Tabelle 14	Durch kulturelle Anzucht und PCR-Verfahren ermittelte Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-positiven Schweinen46
Tabelle 15	Betriebe mit Einzel- und Mehrfach-Nachweisen von schwach hämolysierende Brachyspiren48
Tabelle 16	Anzahl der Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-infizierten Tieren in Abhängigkeit zur Herkunft der Tiere49
Tabelle 17	Anzahl der Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-infizierten Tieren in Abhängigkeit vom Belegungsverfahren50
Tabelle 18	Anzahl der Betriebe mit <i>Brachyspira</i> spp.-infizierten Tieren in Abhängigkeit von der Haltungsform52
Tabelle 19	Nachweis schwach hämolysierender Brachyspiren in Sammelkotproben von Tieren mit bzw. ohne Durchfall53
Tabelle 20	Nachgewiesene Einzel- und Mehrfach-Nachweise von schwach hämolysierenden Brachyspiren in Sammelkotproben aus Buchten mit durchfallkranken Tieren.....54
Tabelle 21	<i>Brachyspira</i> spp. positive Betriebe mit und ohne durchfallkranken Schweine55
Tabelle 22	Einzel- und Mehrfachnachweise von schwach hämolysierenden Brachyspiren in Betrieben mit bzw. ohne durchfallkranke Tiere.....56
Tabelle 23	Ergebnis der differentialdiagnostisch-mikrobiologischen Untersuchung57

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden wäre.

Prof. em. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die zur Durchführung der Arbeit notwendigen Mittel sowie für seine Unterstützung bei der Finanzierung dieser Arbeit.

Bei der H. Wilhelm Schaumann Stiftung bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen des Stipendiums.

Dr. Werner Herbst danke ich dafür, dass er jederzeit für Fragen, Ideen und Diskussionen zur Verfügung stand sowie für die schnellen Korrekturen der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Stefanie Barth, die mir stets, auch bereits als sie nicht mehr in Gießen war, bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite stand.

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner und Prof. Dr. Hermann Willems danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatten und stets für schweinespezifische- und/oder Laborfragen zur Verfügung standen.

Bei Jörg Heuser bedanke ich mich sehr für die vielen lustigen Stunden, die guten Gespräche und Ratschläge während der gesamten Zeit.

Regina Weil danke ich für ihre große Unterstützung im Labor, die mir eine immense Zeitersparnis war.

Meinen Doktoranden-Kolleginnen Birte Bovermann, Wibke Küppers, Monika Meves-Baier und Inka Stolle danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im obersten Stockwerk und die unvergesslichen Stunden mit unzähligen Geschichten, die uns so oft zum Lachen brachten.

Allen anderen Kollegen/innen im IHIT, die hier nicht namentlich genannt werden können, sage ich vielen Dank für die angenehme (Arbeits)atmosphäre im Haus.

Bei Herrn Dr. Feyling und Frau Sparenberg bedanke ich mich für ihre äußerst nette und schnelle Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Freundinnen und Freunden in und außerhalb von Gießen, an denen diese Arbeit nicht spurlos vorüber gegangen ist. Vor allem meiner Freundin Dr. Sonja Hillen, die mich in jeglicher Form unterstützt und immer wieder motiviert hat.

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Disseration angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Disseratation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlichen Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6328-3



9 17 8 3 8 3 5 19 6 3 2 8 3 11